

抗 CD40 抗体、其抗原结合片段及医药用途

5 本申请要求 2021 年 06 月 28 日提交的申请号为 202110722124.0 的中国专利申请
的优先权。

技术领域

10 本公开涉及生物医药领域,特别是治疗或干预与 CD40/CD40L 信号通路相关疾
病的领域。具体而言,本公开涉及 CD40 抗体、其抗原结合片段及其药物组合物,
及用于治疗自身免疫疾病的方法和相关制药用途。

背景技术

15 CD40 属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族,是一种定位在细胞膜表面的
I 型跨膜糖蛋白,分子量约为 48kDa,在免疫系统中发挥重要作用。CD40 表达在
多种免疫细胞中,如 B 细胞、树突细胞、单核细胞和巨噬细胞,也在血小板上表达,
并且在某些条件下可以在嗜酸性粒细胞和实质细胞上表达。CD40 的天然配体为
CD154 或 CD40L,是一种 II 型跨膜蛋白,可在多种细胞类型上诱导表达,包括活
化的 CD4+ T 细胞、NK 细胞、血小板和 B 细胞(Pucino V 等人,2020)。

20 CD40L 结合 CD40 后,可招募 TRAF 并通过 NF- κ B、JNK 和 MAPK 通路介导
下游信号传导,发挥多种细胞类型依赖性活化结果,包括免疫细胞激活与增殖、炎
症因子和趋化因子分泌等(Vonderheide RH 等人,2007)。例如,通过所述途径
的信号传导对于适应性免疫系统的若干重要效应子功能是必需的,包括原发性 T
细胞依赖性抗体应答(TDAR)、B 细胞增殖、生发中心(GC)形成、免疫球蛋白(Ig)
同种型转换、体细胞突变、以及记忆 B 细胞和浆细胞的分化(Foy TM 等人,1993;
25 Foy TM 等人,1994)。除了对 B 细胞产生影响外,CD40 途径活化为 DC 成熟和
功能以及单核细胞和巨噬细胞存活和细胞因子分泌提供了重要信号(Caux, C 等人,
1994)。

30 CD40 信号通路的功能调节障碍可导致自身免疫疾病(Karnell JL 等人,2018)。
CD40-CD40L 信号通路被发现参与炎症组织中实质细胞的功能:来自肾、唾液腺
和皮肤等部位,可分泌趋化因子的活化上皮细胞能够响应 CD40。此外,CD40 或
CD40L 在动脉粥样硬化患者及临床前动脉粥样硬化模型的病变部位中的表达水平
平均升高。CD40 可刺激诱导基质降解酶的表达,促进与动脉粥样硬化致病相关的细
胞类型如内皮细胞、平滑肌细胞及巨噬细胞等中的组织因子表达(Michel NA 等人,
2017)。CD40 通路上调 IL-1、IL-6 及 IL-8 等炎症因子、以及细胞间黏附分子
35 -1(ICAM-1)、E-选择素(E-selectin)及血管细胞黏附分子(VCAM)等的粘附分子的生
成。CD40/CD40L 相互作用还被用来预防移植排异,在恒河猴的肾脏同种异体移植
研究中使用嵌合抗 CD40 拮抗剂 ch5D12 表明,CD40 的拮抗作用足以改善病情并
延长平均存活时间超过 100 天。当将 ch5D12 与抗 CD86 抗体组合并仅在同种异体
移植研究开始时给予,随后用环孢素进行延长治疗时,实现大于 4 年的平均存活
40 时间,这表明这种组合可潜在地诱导免疫耐受性(Haanstra 等人,2005)。

大量临床前研究提供了 CD40/CD40L 相互作用在促进 T 细胞依赖性免疫应答中的关键作用的证据。因此，CD40 信号传导的阻断被认为是在诸如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、干燥综合征等疾病中抑制致病性自身免疫应答的合适且需要的治疗策略。目前，尚未批准任何抗 CD40 抗体用于此类疾病的治疗。因此，本领域仍然亟需可用于干预 CD40-CD40L 的相互作用并阻断 CD40 信号传导的治疗剂。本公开提供了这样的治疗性人源化抗 CD40 抗体，其能特异性结合 CD40，具有可用于干预或治疗 CD40 信号通路相关疾病，特别是自身免疫疾病的优异的抗原结合特异性、亲和力、药代动力学和药效学特性。以及，提供治疗性人源化抗 CD40 抗体和他莫克司联合用于治疗移植物抗宿主病或缓解移植排异反应。

10

发明内容

本公开提供了一种抗 CD40 抗体及其抗原结合片段，其编码多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体、宿主细胞、包含所述抗体或其抗原结合片段的药物组合物、其用于治疗或干预自身免疫疾病（包括移植物抗宿主病、移植排异）的方法和相

15

抗 CD40 抗体、其抗原结合片段

一方面，一些实施方案中，本公开提供抗 CD40 抗体及其抗原结合片段，包含：

重链 HCDR1，其包含如 SEQ ID NO:23 所示的序列；

重链 HCDR2，其包含如 SEQ ID NO:24 所示的序列；

20

重链 HCDR3，其包含如 SEQ ID NO:25 所示的序列；

轻链 LCDR1，其包含如 QX₁SEDISSNLX₂ (SEQ ID NO:74)所示的序列，其中，X₁选自 A 或 S，X₂选自 A 或 S；

轻链 LCDR2，其包含如 X₃ASNLAS (SEQ ID NO:75)所示的序列，其中，X₃选自 A 或 P；和

25

轻链 LCDR3，其包含如 QGX₄YWX₅X₆X₇SX₈FGX₉X₁₀ (SEQ ID NO:76)所示，其中，X₄选自 A 或 G，X₅选自 S 或 T，X₆选自 S 或 G，X₇选自 T 或 S，X₈选自 N 或 Y，X₉选自 N、S、T 或 Q，X₁₀选自 V 或 G。

一些具体实施方案中，提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含：

重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；和/或，轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:26、27、28 所示的序列；

重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；和/或，轻链 LCDR1，包含如 SEQ ID NO:29 所示的序列；轻链 LCDR2，包含如 SEQ ID NO:30 所示的序列；轻链 LCDR3，包含如 QGGYWTSTSNFGX₉X₁₀ (SEQ ID NO:73)所示的序列，其中，X₉选自 N、S、T 或 Q，X₁₀选自 V 或 G；

重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；和/或，轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:29、27、32 所示的序列。

一些具体实施方案中，提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含：

重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的

序列；轻链 LCDR1，包含如 SEQ ID NO:29 所示的序列；轻链 LCDR2，包含如 SEQ ID NO: 30 所示的序列；轻链 LCDR3，包含如 SEQ ID NO:69-72 任一所示的序列。

一些具体实施方案中，本公开提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含前述
5 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3 中的任一个，或其任意组合。

另一方面，一些实施方案中，本公开提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含：

重链 HCDR1，其包含如 SYGVX₁₁ (SEQ ID NO:88)所示的序列，其中，X₁₁ 选自 S 或 T；
10

重链 HCDR2，其包含如 X₁₂IX₁₃SX₁₄GX₁₅X₁₆YYAX₁₇WAX₁₈S (SEQ ID NO:89) 所示的序列，其中，X₁₂ 选自 A 或 G，X₁₃ 选自 G 或 A，X₁₄ 选自 T、S 或 D，X₁₅ 选自 T 或 S，X₁₆ 选自 T 或 A，X₁₇ 选自 S、N，X₁₈ 选自 K 或 R；

重链 HCDR3，其包含如 GGITX₁₉YAX₂₀ (SEQ ID NO:90)所示的序列，其中，
15 X₁₉ 选自 A 或 V，X₂₀ 选自 I 或 M；

轻链 LCDR1，其包含如 QASX₂₁X₂₂IX₂₃X₂₄X₂₅LA (SEQ ID NO:91)所示的序列，其中，X₂₁ 选自 Q 或 E，X₂₂ 选自 S 或 D，X₂₃ 选自 S 或 T，X₂₄ 选自 N、Q、S 或 T，X₂₅ 选自 V 或 G；

轻链 LCDR2，其包含如 SEQ ID NO:37 所示的序列；和

20 轻链 LCDR3，其包含如 QSYX₂₆X₂₇SX₂₈X₂₉TX₃₀ (SEQ ID NO:92)所示的序列，其中，X₂₆ 选自 F 或 Y，X₂₇ 选自 S、D 或 N，X₂₈ 选自 S 或 F，X₂₉ 选自 S、T 或 Y，X₃₀ 选自 V 或 I。

一些具体实施方案中，提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含：

重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:33、34、35 所示的
25 序列；和/或，轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:36、37、38 所示的序列；

重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:39、40、41 所示的序列；和/或，轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:42、37、43 所示的序列；

30 重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:39、44、35 所示的序列；和/或，轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:45、37、46 所示的序列；

重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:39、47、41 所示的序列；和/或，轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:36、37、
35 48 所示的序列；

重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:39、47、49 所示的序列；和/或，轻链 LCDR1，包含如 QASQISX₂₄X₂₅LA (SEQ ID NO:87)所示的序列，其中，X₂₄ 选自 N、Q、S 或 T，X₂₅ 选自 V 或 G；轻链 LCDR2，包含如 SEQ ID NO: 50 所示的序列；轻链 LCDR3，包含如 SEQ ID NO: 48 所示的序列。

一些具体实施方案中，提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含：

重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:39、47、49 所示的序列；轻链 LCDR1，包含如 SEQ ID NO:83-86 任一所示的序列；轻链 LCDR2 和轻链 LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:50、48 所示的序列。

5 一些具体实施方案中，本公开提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含前述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3 中的任一个，或其任意组合。

另一方面，一些实施方案中，本公开提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含：重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:51、52、53 所示的序列，和/或，轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:54、55、56 所示的序列。

一些实施方案中，本公开提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含：重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:57、58、59 所示的序列，和/或，轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:60、61、62 所示的序列。

15 一些具体实施方案中，本公开提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含前述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3 中的任一个，或其任意组合

另一方面，本公开提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，其中：

a-1) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 1 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 2 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

a-2) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 3 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 4 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

25 a-3) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 5 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 6 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

a-4) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 67 或 68 任一所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 63-66 任一所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

30 b-1) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 7 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 8 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-2) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 9 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 10 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

35 b-3) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 11 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 12 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-4) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 13 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 14 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-5) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 15 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 16 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-6)所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 17 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 18 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-7)所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 81 或 82 任一所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 77-80 任一所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、
5 LCDR3；

c)所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 19 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 20 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；或

d)所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 21 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 22 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

10 其中，所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的。一些具体实施方案中，CDR 是根据 Kabat 编号系统定义的。

一些实施方案中，前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段为重组抗体。

一些实施方案中，前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段为兔源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体或其抗原结合片段。

15 一些实施方案中，当前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段为人源化抗体时，重链框架区源自 IGHV2-26*01、IGHV4-30-4*02、IGHV4-4*08、IGHJ1*01；和/或，轻链框架区源自 IGKV1-13*02、IGKV1-9*01、IGKV1-6*01、IGKJ4*01。例如，重链框架区的 FR1-FR3 源自 IGHV2-26*01、IGHV4-30-4*02、IGHV4-4*08，重链框架区的 FR4 源自 IGHJ1*01；轻链框架区的 FR1-FR3 源自 IGKV1-13*02、
20 IGKV1-9*01、IGKV1-6*01，轻链框架区的 FR4 源自 IGKJ4*01。

一些实施方案中，前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL，其中，

A-1)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示或与之具有至少 90%同一性；

A-2)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示或与之具有至少 90%同一性；

A-3)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示或与之具有至少 90%同一性；

A-4)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 67 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 63-66 任一所示或与之具有至少 90%同一性；

30 A-5)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 68 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 63-66 任一所示或与之具有至少 90%同一性；

B-1)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示或与之具有至少 90%同一性；

B-2)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示或与之具有至少 90%同一性；

B-3)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示或与之具有至少 90%同一性；

B-4)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示或与之具有至少 90%同一性；

B-5)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示或与之具有至少 90%同一性, VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示或与之具有至少 90%同一性;

B-6)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示或与之具有至少 90%同一性, VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示或与之具有至少 90%同一性;

5 B-7)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 81 所示或与之具有至少 90%同一性, VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 77-80 任一所示或与之具有至少 90%同一性;

B-8)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 82 所示或与之具有至少 90%同一性, VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 77-80 任一所示或与之具有至少 90%同一性;

10 C)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示或与之具有至少 90%同一性, VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示或与之具有至少 90%同一性; 或

D)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示或与之具有至少 90%同一性, VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示或与之具有至少 90%同一性。

一些实施方案中, 前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段为 IgG 抗体或其抗原结合片段, 例如为 IgG1、IgG2、IgG2、IgG4 抗体或其抗原结合片段, 例如为具有
15 N297A 突变的 IgG1 抗体或其抗原结合片段, 例如为具有 L234A、L235A、M252Y、S254T 和 T256E 中之一或其任意组合的 IgG1 抗体或其抗原结合片段。

一些实施方案中, 前述抗 CD40 抗体的抗原结合片段为 Fab、Fv、sFv、Fab'、F(ab')₂、线性抗体、单链抗体、scFv、sdAb、sdFv、纳米抗体、肽抗体 peptibody、结构域抗体和多特异性抗体(双特异性抗体、diabody、triabody 和 tetraabody、串联
20 二-scFv、串联三-scFv), 例如为 scFv、Fv、Fab 或 Fab' 片段。

一些实施方案中, 前述抗 CD40 抗体的抗原结合片段的重链全长的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 93 或 97 所示或与之具有至少 90%同一性; 轻链全长的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 94 所示或与之具有至少 90%同一性; 或

25 重链全长的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 95 或 98 所示或与之具有至少 90%同一性; 轻链全长的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 96 所示或与之具有至少 90%同一性。

如前所述的“至少 90%同一性”例如包含至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%同一性。

一些实施方案中, 前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段的重链可变区有 0 至 10
30 个(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个)氨基酸变化; 轻链可变区有 0 至 10 个(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个)氨基酸变化。在一些具体实施方案中, 所述氨基酸变化为保守的替换、取代或修饰, 和/或不影响功能的缺失、添加。

一些实施方案中, 提供抗 CD40 抗体或抗原结合片段, 其与前述抗 CD40 抗体或抗原结合片段结合或竞争结合相同的表位。

35 一些实施方案中, 提供抗 CD40 抗体或抗原结合片段, 其阻断前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段与 CD40(例如人 CD40)的结合。

一些实施方案中, 提供抗 CD40 抗体或抗原结合片段, 其与 CD40(例如人 CD40)的结合被前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段阻断。

一些实施方案中, 前述抗 CD40 抗体或抗原结合片段具有以下至少一项:

(i) 以 10nM 或更低的 K_D 结合人 CD40;

(ii) 无明显的激动活性。

一些实施方案中, 前述抗 CD40 抗体或抗原结合片段使 CD40 配体与 CD40 的结合降低至少 45%、至少 50%、至少 60%、至少 75%、至少 80%、至少 90% 或至少 95%。

一些实施方案中, 前述抗 CD40 抗体或抗原结合片段以 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M 或更低的 K_D 结合人 CD40。

一些实施方案中, 提供 CD40 结合分子, 包含前述任意的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。

一些实施方案中, 提供缀合物, 其包含前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。例如, 所述缀合物为抗体药物偶联物。

多核苷酸和载体

本公开提供经分离的多核苷酸, 其编码本公开的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。所述分离的多核苷酸可以为 RNA、DNA 或 cDNA。根据本公开的一些实施方案, 本公开的多核苷酸是分离的多核苷酸。

本公开还提供 DNA 分子, 其编码前述本公开任意的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。

本公开的多核苷酸也可呈载体形式, 可存在于载体中和/或可为载体的一部分, 该载体例如质粒、粘端质粒、YAC 或病毒载体。载体可尤其为表达载体, 即可提供 VEGF 结合分子或其缀合物体外和/或体内 (即在适合宿主细胞、宿主有机体和/或表达系统中) 表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本公开的多核苷酸, 其可操作地连接至一个或多个适合的表达调控元件 (例如启动子、增强子、终止子等)。针对在特定宿主中的表达对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员的常识。对本公开的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段的表达有用或必需的调控元件及其他元件例如为启动子、增强子、终止子、整合因子、选择标记物、前导序列、报告基因。

本公开的多核苷酸可基于本公开的多肽的氨基酸序列的信息通过已知的方式 (例如通过自动 DNA 合成和/或重组 DNA 技术) 制备或获得, 和/或可从适合的天然来源加以分离。

宿主细胞

本公开提供表达本公开的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段或缀合物或含有本公开的多核苷酸或载体的重组宿主细胞。一些实施方案中, 宿主细胞为细菌细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

细菌细胞例如包括革兰氏阴性细菌菌株 (例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株、变形杆菌属 (*Proteus*) 菌株及假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 菌株) 及革兰氏阳性细菌菌株 (例如芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 菌株、链霉菌属 (*Streptomyces*) 菌株、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 菌株及乳球菌属 (*Lactococcus*) 菌株) 的细胞。

真菌细胞例如包括木霉属 (*Trichoderma*)、脉孢菌属 (*Neurospora*) 及曲菌属 (*Aspergillus*) 的物种的细胞; 或者包括酵母属 (*Saccharomyces*) (例如酿酒酵母

(*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*) (例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*))、毕赤酵母属(*Pichia*) (例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)及嗜甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*))及汉森酵母属(*Hansenula*)的物种的细胞。

5 哺乳动物细胞例如包括例如 HEK293 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞等。

然而,本公开也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其他细胞。

10 在一个实施方案中,本公开中使用的宿主细胞不能发育成完成的植株或动物个体。

制备方法

本公开还提供了一种制备本公开的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段的方法,其包括:

- 15 - 在允许表达本公开的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段的条件下培养本公开的宿主细胞;及
- 从培养物回收由所述宿主细胞表达的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段;及
- 任选的,包括进一步纯化和/或修饰本公开的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。

20 本公开提供缀合物的制备方法,包括将药物偶联或修饰到本公开的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段上。

本公开的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段可在如上所述细胞中以细胞内方式(例如在细胞质中、在周质中或在包涵体中)产生,接着从宿主细胞分离且任选进一步纯化;或其可以细胞外方式(例如在培养宿主细胞的培养基中)产生,接着自培养基分离且任选进一步纯化。例如,用含调整过的缓冲液的 A 或 G
25 Sepharose FF 柱进行纯化,洗去非特异性结合的组分,再用 PH 梯度法洗脱结合的抗体,用 SDS-PAGE 检测,收集。可选地,用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体,也可以用常规方法去除,比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻,如-70℃,或者冻干。

30 用于重组产生多肽的方法及试剂,例如特定适合表达载体、转化或转染方法、选择标记物、诱导蛋白表达的方法、培养条件等在本领域中是已知的。类似地,适用于制造本公开的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段或缀合物的方法中的蛋白分离及纯化技术为本领域技术人员所公知。

组合物

35 本公开提供组合物,包含前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。例如,提供药物组合物,其含有治疗或缓解有效量的如上所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段和至少一种可药用的赋形剂、稀释或载体。

在一些具体实施方式中,所述药物组合物单位计量中可含有 0.01 至 99 重量%的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段,或药物组合物单位剂量中含抗 CD40 抗体或其抗原结合片段的量为 0.1-2000mg,在一些具体实施方式中为 1-1000mg。

在一些实施方案中，提供前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段与一种或多种另外的免疫抑制剂的组合或组合物。所述组合物例如是药物组合物。可选地，所述药物组合物可进一步包含可药用的赋形剂、稀释或载体。

在本公开的一个实施方案中，提供了一种药物组合物，其包含前述抗 CD40 5 抗体或其抗原结合片段、他克莫司、以及可药用的赋形剂、稀释或载体。

一些实施方案中，提供制品，包含前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。可选地，制品包含容器和标签。容器例如瓶、注射器和试管。容器容纳有效于治疗病症的组合物。容器上或与容器相连的标签表明所述组合物用于治疗所选病症。组合物中含有前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。所述制品可以进一步包括第二容 10 器，所述第二容器容纳有效于治疗病症的他克莫司。

一些实施方案中，提供产品，包含前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段和他克莫司。

治疗方法和制药用途

本公开提供前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段用于治疗、干预、预防、诊断 15 疾病或病症的方法。

具体地，在一些实施方案中，本公开提供了根据本公开所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗或缓解自身免疫疾病、移植物抗宿主病、或缓解移植排斥反应的药物中的用途。

进一步地，在一些实施方案中，本公开提供了根据本公开所述的抗 CD40 抗体 20 或其抗原结合片段与一种或多种其他免疫抑制剂组合在制备用于治疗或缓解自身免疫疾病、移植物抗宿主病、或缓解移植排斥反应的药物中的用途。

在本公开的实施方案中，根据本公开所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段可与一种或多种其他免疫抑制剂分开地、相续地或同时施用。

在本公开的实施方案中，根据本公开所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段可 25 在一种或多种其他免疫抑制剂之前、之后或同时施用。

具体地，本公开提供了根据本公开所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段与他克莫司组合在制备用于治疗或缓解自身免疫疾病、移植物抗宿主病、或缓解移植排斥反应的药物中的用途。一些实施方案中，提供改善或治疗移植物抗宿主病、器官移植排斥的方法和相关制药用途，包括向受试者施用改善或治疗有效量的前 30 述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段或其药物组合物。

一些实施方案中，提供改善或治疗自身免疫性疾病、炎性疾病的方法和相关制药用途，包括向受试者施用改善或治疗有效量的前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段或其药物组合物。

一些实施方案中，提供治疗 CD40 相关障碍疾病的方法和相关制药用途；一些 35 实施方案中，提供抑制 CD40 相关障碍细胞生长或分化的方法和相关制药用途；一些实施方案中，提供抑制表达人 CD40 抗原的细胞的生长和/或分化的方法和相关制药用途；一些实施方案中，提供抑制受试者中 B 细胞的抗体产生的方法和相关制药用途；一些实施方案中，提供治疗患有免疫障碍疾病的方法和相关制药用途。上述方法中，均包括向受试者或细胞施用治疗或抑制有效量的前述抗 CD40 抗体或

其抗原结合片段或其药物组合物。

一些实施方案中，提供诱导外周 B 细胞耗竭的方法和相关制药用途，包括向受试者施用诱导有效量的前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段或其药物组合物。

5 一些实施方案中，提供治疗、缓解疾病或病症的方法和相关制药用途，包括向有需要的受试者施用有效量的前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，所述疾病或病症可以是 CD40 相关或 CD40 不相关的，包括：类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、狼疮肾炎、自身免疫性脱髓鞘疾病(例如多发性硬化症、变应性脑脊髓炎)、内分泌性眼病、葡萄膜视网膜炎、全身性红斑狼疮、重症肌无力、格雷夫斯病、肾小球性肾炎、自身免疫性肝病、炎性肠病(例如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)、过敏症、
10 过敏反应、舍格伦综合征、I 型糖尿病、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳氏肉芽肿病、纤维肌痛、多肌炎、皮炎、炎性肌炎、多发性内分泌衰竭、施密特氏综合征(Schmidt's syndrome)、自身免疫性葡萄膜炎、阿迪森氏病、肾上腺炎、甲状腺炎、桥本氏甲状腺炎、自身免疫性甲状腺疾病、恶性贫血、胃萎缩、慢性肝炎、狼疮性肝炎、动脉粥样硬化、亚急性皮肤性红斑狼疮、甲状旁腺机能减退、德雷斯勒综合征(Dressler's syndrome)、自身免疫性血小板减少症、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、寻常性天疱疮、天疱疮、疱疹样皮炎、斑秃(alopecia areata)、类天疱疮、硬皮病、进行性全身性硬化症、CREST 综合征(钙质沉着、雷诺氏现象(Raynaud's phenomenon)、食管活动不良、指端硬化和毛细血管扩张)、男性和女性自身免疫性不育症、强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis)、溃疡性结肠炎、混合性结缔组织病、
20 结节性多动脉炎、系统性坏死性血管炎、特应性皮炎、特应性鼻炎、古德帕斯彻氏综合征(Good pasture's syndrome)、恰加斯氏病(Chagas' disease)、结节病、风湿热、哮喘、复发性流产、抗磷脂综合征、农民尘肺、多形性红斑、心脏切开后综合征、库欣综合征(Cushing's syndrome)、自身免疫性慢性活动性肝炎、养鸟迷的肺、中毒性表皮坏死松解症、阿尔波特综合征(Alport's syndrome)、肺炎泡炎、过敏性肺炎泡炎、纤维性肺炎泡炎、间质性肺病、结节性红斑、坏疽性脓皮病、输血反应、高安氏动脉炎(Takayasu's arteritis)、风湿性多肌痛、颞动脉炎、血吸虫病、巨细胞动脉炎、蛔虫病、曲霉病、桑普特氏综合征(Sampter's syndrome)、湿疹、淋巴瘤样肉芽肿、贝塞特氏病(Behcet's disease)、卡普兰氏综合征(Caplan's syndrome)、川崎氏病(Kawasaki's disease)、登革热、脑脊髓炎、心内膜炎、心肌内膜纤维变性、眼内炎、持久隆起性红斑、牛皮癣、胎儿成红细胞增多病、嗜酸性筋膜炎、舒尔曼综合征(Shulman's syndrome)、费耳蒂氏综合征(Felty's syndrome)、丝虫病、睫状体炎、慢性睫状体炎、异时性睫状体炎、福氏睫状体炎(Fuch's cyclitis)、IgA 肾病、亨-舍二氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)、移植物抗宿主病、移植排斥反应、心肌炎、
30 伊顿-兰伯特综合征(Eaton-Lambert syndrome)、复发性多发性软骨炎、冷球蛋白血症、瓦尔登斯特罗姆巨球蛋白血症、埃文氏综合征(Evan's syndrome)、急性呼吸窘迫综合征、肺部炎症、骨质疏松症、迟发型超敏反应和自身免疫性腺衰竭。例如，干燥综合征、多发性硬化和系统性红斑狼疮。

一些实施方案中，提供治疗 B 淋巴细胞(例如全身性红斑狼疮、古德帕斯彻氏综合征、类风湿性关节炎和 I 型糖尿病)、Th1 淋巴细胞(例如类风湿性关节炎、多

发性硬化症、牛皮癣、舍格伦综合征、桥本氏病、格雷夫氏病、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳肉芽肿病、结核病或移植物抗宿主病)或 Th2 淋巴细胞(例如特应性皮炎、全身性红斑狼疮、特应性哮喘、鼻结膜炎、过敏性鼻炎、欧门氏综合征(Omenn's syndrome)、系统性硬化症或慢性移植物抗宿主病)相关疾病的方法和相关制药用途，包括向有需要的受试者施用有效量的前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。

一些实施方案中，提供治疗肿瘤或癌症的方法和相关制药用途，包括向有需要的受试者施用有效量的前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，所述肿瘤或癌症可以是 CD40 表达相关或不相关的。

一些实施方案中，提供治疗或缓解移植物抗宿主病或移植排异反应的方法，包括向有需要的受试者施用前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段和他克莫司。

一些实施方案中，提供前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段用于制备治疗或缓解移植物抗宿主病或移植排异反应的药物的用途，包括和他克莫司联用。一些实施方案中，提供他克莫司用于制备治疗或缓解移植物抗宿主病或移植排异反应的药物的用途，包括和前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段联用。

一些实施方案中，提供前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段和他克莫司联合用于治疗或缓解移植物抗宿主病或移植排异反应的方法，以及联合用于制备治疗或缓解移植物抗宿主病或移植排异反应的药物的用途。

一些实施方案中，上述移植为实体器官移植，例如肾移植、肝移植、心脏移植、肺移植、胰腺移植、小肠移植或复合组织移植。

一些实施方案中，上述移植是指移植选自同种细胞、异种细胞、同种组织、异种组织、同种器官及异种器官组成组中的一种。

一些实施方案中，前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段抑制或逆转基于移植受体的组织移植物的排异反应，或者延长或保留移植到移植受体的组织的功能，或者恢复移植受体中的受损移植组织的功能。

25 检测

本公开提供检测 CD40 的组合物，所述组合物包含根据本公开的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。本公开还提供用于体内或体外检测 CD40 的方法、系统或装置，其包括用本公开的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段处理样品。

一些实施方案中，体外检测方法、系统或装置可能例如包括：

- 30 (1) 使样品与抗 CD4 抗体或其抗原结合片段接触；
(2) 检测在抗 CD40 抗体或其抗原结合片段和样品之间形成的复合物；和/或
(3) 使参比样品（例如，对照样品）与抗体接触；和
(4) 通过与参比样品比较，确定复合物形成的程度。如与对照样品或受试者
35 中相比，样品或受试者中复合物形成的变化（例如，统计学上的显著变化）表示样品中存在 CD40。

另一些实施方案中，体内检测方法、系统或装置可以包括：

- (1) 向受试者施用抗 CD40 的抗体或其抗原结合片段；和
(2) 检测在抗 CD40 的抗体或其抗原结合片段和受试者之间复合物的形成。

检测可以包括确定形成复合物的位置或时间。用可检测物质对 CD40 抗体标记，通过对所述标记检测以实现结合 CD40 抗体的物质（例如 CD40）的检测。合适的可检测物质包括多种酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射性物质。可以通过测量与 CD40 结合或不结合的抗体或使其可视化，检测在结合 CD40 的抗体或其抗原结合片段和 CD40 之间的复合物形成。可以使用常规检测测定法，例如，酶联免疫吸附测定（ELISA）、放射免疫测定（RIA）或组织免疫组织化学。出于检测目的，本公开的抗 CD40 抗体或其片段可以用荧光团发色团标记。

一些实施方案中，还提供试剂盒，所述试剂盒包含与抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，还可以包含诊断使用说明。试剂盒还可以含有至少一种额外的试剂，如标记物或额外的诊断剂。对于体内使用，抗体可以配制为药物组合物。

术语定义

为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义，本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不限于”的意义。

本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558(1968) 中所述。

“CD40”和“CD40 抗原”是指在正常和赘生性 B 细胞表面上表达的约 48kD 糖蛋白，其充当参与细胞增殖和分化的信号的受体 (Ledbetter 等人,1987,J.Immunol.138:788-785)。已从由伯基特氏淋巴瘤细胞系 Raji 制备的文库中分离出编码 CD40 的 cDNA 分子(Stamenkovic 等人,1989,EMBO J.8:1403)。序列信息可参见本公开表 2。内源性表达 CD40 的细胞是特征在于 CD40 的表面表达的任何细胞，包括但不限于正常和赘生性 B 细胞、交错突细胞、基底上皮细胞、癌细胞、巨噬细胞、内皮细胞、滤泡树突细胞、扁桃体细胞和骨髓来源的浆细胞。

“抗体”以最广义使用，涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体（例如双特异性抗体），全长抗体和抗体片段（或抗原结合片段，或抗原结合部分），只要它们展现出期望的抗原结合活性。抗体可以指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区（V 区）；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区（C 区）。可变区包括 3 个高变区（CDR）

和 4 个序列相对保守的骨架区 (FR)。3 个高变区决定抗体的特异性, 又称为互补性决定区 (CDR)。每条轻链可变区 (VL) 和重链可变区 (VH) 由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成, 从氨基端到羧基端依次排列的顺序为: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1, LCDR2, 和 LCDR3; 重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3。

对于 CDR 的确定或定义, 能够通过分辨抗体的结构和/或分辨抗体-配体复合物的结构来完成 CDR 的确定性描绘和包含抗体的结合位点的残基的鉴定。这可通过本领域技术人员已知的各种技术中的任一种, 例如 X 射线晶体学来实现。多种分析方法可用于鉴定 CDR, 包括但不限于 Kabat 编号系统、Chothia 编号系统、AbM 编号系统、IMGT 编号系统、接触定义、构象定义。

Kabat 编号系统是用于编号抗体中残基的标准并且通常用于鉴定 CDR 区域(参见例如 Johnson&Wu, 2000, Nucleic Acids Res., 28: 214-8)。Chothia 编号系统与 Kabat 编号系统类似, 但 Chothia 编号系统考虑了某些结构环区域的位置。(参见例如 Chothia 等, 1986, J.Mol.Biol., 196: 901-17; Chothia 等人, 1989, Nature, 342: 877-83)。AbM 编号系统使用建模抗体结构的由 Oxford Molecular Group 生产的计算机程序集成套件 (参见例如 Martin 等, 1989, ProcNatl Acad Sci (USA), 86: 9268-9272; “AbMTM, A Computer Program for ModelingVariable Regions of Antibodies,”Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd)。AbM 编号系统使用知识数据库和从头开始方法的组合, 从基本序列建模抗体的三级结构 (参见 Samudrala 等, 1999, 在 PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl., 3: 194-198 中的“Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined HierarchicalApproach”描述的那些)。接触定义基于可用复杂晶体结构的分析 (参见例如 MacCallum 等, 1996, J.Mol.Biol., 5: 732-45)。构象定义中, CDR 的位置可鉴定为对抗原结合做出焓贡献的残基 (参见例如 Makabe 等, 2008, Journal ofBiological Chemistry, 283: 1156-1166)。另外其它的 CDR 边界定义可能不严格遵循上述方法之一, 但仍然与 Kabat CDR 的至少一部分重叠, 尽管根据特定残基或残基组不显著影响抗原结合的预测或实验结果, 它们可缩短或延长。如本公开使用的, CDR 可指通过本领域已知的任何方法 (包括方法的组合) 定义的 CDR。各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的, 示例性的, 如下表 1 中所示。

表 1. CDR 编号系统之间的关系

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

本公开的抗体或抗原结合片段的 VL 区和 VH 区的 CDR 氨基酸残基在数量和

位置符合已知的 Kabat 编号系统。

“单克隆抗体”或“单抗”指从基本上同质的抗体群体获得的抗体，即除了可能以少量存在的天然存在的突变之外，群体包含的各个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的，针对单个抗原位点。此外，与通常包括针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制剂相反，每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰语“单克隆”指示如从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征，并且不被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。

术语“兔源抗体”在本公开中为根据本领域知识和技能制备的针对人 CD40 或其表位的单克隆抗体。制备时用 CD40 抗原注射试验兔，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体。在本公开一个具体的实施方案中，所述的兔源抗人 CD40 抗体或其抗原结合片段，可进一步包含兔源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区，或进一步包含兔源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区。

术语“全人抗体”包括具有人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本公开的全人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变所引入的突变）。然而，术语“全人抗体”不包括这样的抗体，即其中已将衍生自另一种哺乳动物物种（诸如兔）种系的 CDR 序列移植到人骨架序列上（即“人源化抗体”）。

术语“人源化抗体（humanized antibody）”，也称为 CDR 移植抗体（CDR-grafted antibody），是指将非人 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量非人蛋白成分，从而诱导的强烈的免疫应答反应。为避免在免疫原性下降的同时引起活性的下降，可对所述的全人抗体可变区可进行最少反向突变，以保持活性。

术语“嵌合抗体（chimeric antibody）”，是将第一物种抗体的可变区与第二物种抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻第一物种抗体诱发的免疫应答反应。作为一个示例，建立嵌合抗体，要先建立分泌兔源性特异性单抗的兔，分离所述抗体，根据需要克隆全人抗体的恒定区基因，将兔可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入人载体中，最后在真核工业系统或原核工业系统中表达嵌合抗体分子。全人抗体的恒定区可选自人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区，优选包含人源 IgG1 或 IgG4 重链恒定区，或者使用氨基酸突变后无 ADCC（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用）毒性的 IgG1。

术语“抗原结合片段”包括：单链抗体（即全长重链和轻链）；Fab、修饰的 Fab、Fab'、修饰的 Fab'、F(ab')₂、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、单结构域抗体（例如 VH 或 VL 或 VHH）、scFv、二价或三价或四价抗体、Bis-scFv、diabody、tribody、triabody、tetrabody 和上述任意一种的表位结合片段（参见例如 Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9) :1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews-Online 2 (3) ,209-217）。产生和制备这些抗体片段的方法在本领域是公知的（参见例如 Verma 等人, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181）。Fab-Fv 形式首先公开于 WO2009/040562，其二硫键稳定化形式 Fab-dsFv 首先公开

于 WO2010/035012。本公开的抗原结合片段还包括描述于 WO2005/003169、WO2005/003170 和 WO2005/003171 中的 Fab 和 Fab' 片段。多价抗体可包含多特异性例如双特异性或可以是单特异性的（参见例如 WO92/22583 和 WO05/113605），后者中的一个示例是描述于 WO 92/22583 中的 Tri-Fab（或 TFM）。

5 术语“与 CD40 结合”，指能与 CD40 或其表位相互作用，所述 CD40 或其表位可以是人源的。本公开的术语“抗原结合位点”指抗原上不连续的，由本公开抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

术语“抗原”指用于免疫接种免疫活性的脊椎动物的分子，以产生识别抗原的抗体，或筛选表达文库（例如尤其是噬菌体、酵母或核糖体展示文库）。在本公
10 开中，抗原被更广义地定义，包括由抗体特异性识别的靶分子，以及包括用于产生抗体的免疫接种过程或用于选择抗体的文库筛选中使用的分子的一部分或模拟物。对于本公开的与人 CD40 结合的抗体，人 CD40 的单体和多聚体（例如二聚体、三聚体等），以及人 CD40 的截短变体和其它变体均被称为抗原。

术语“表位”是指抗原上与免疫球蛋白或抗体结合的位点。表位可以由相邻
15 的氨基酸、或通过蛋白质的三级折叠而并列的不相邻的氨基酸形成。由相邻的氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂后保持，而通过三级折叠形成的表位通常在变性溶剂处理后丧失。表位通常以独特的空间构象包括至少 3-15 个氨基酸。确定什么表位由给定的抗体结合的方法在本领域中是熟知的，包括免疫印迹和免疫沉淀检测分析等。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术和本公开所述
20 的技术，例如 X 射线晶体分析法和二维核磁共振等。

术语“特异性结合”、“选择性结合”是指抗体与预定的抗原上的表位结合。通常，当使用人 CD40 或其表位作为分析物并使用抗体作为配体，在仪器中通过表面等离子体共振（SPR）技术测定时，抗体以大约低于 10^{-7} M 或甚至更小的平衡解
25 离常数（ K_D ）与预定的抗原或其表位结合，并且其与预定抗原或其表位结合的亲和力和是其与预定抗原（或其表位）或紧密相关的抗原之外的非特异性抗原（如 BSA 等）结合的亲和力的至少两倍。术语“识别抗原的抗体”在本公开中可以与术语“特异性结合的抗体”互换使用。

“结合亲和力”或“亲和力”在本公开中用作两个分子（例如抗体或其部分与抗原）之间的非共价相互作用的强度量度。两个分子之间的结合亲和力可通过
30 确定解离常数（ K_D ）来量化。可通过使用例如表面等离子共振（SPR）方法（Biacore）测量复合物形成和解离的动力学来确定 K_D 。对应于单价复合物的结合和解离的速率常数分别被称为结合速率常数 k_a （或 k_{on} ）和解离速率常数 k_d （或 k_{off} ）。 K_D 通过方程 $K_D = k_d/k_a$ 与 k_a 和 k_d 有关。解离常数的值可通过众所周知的方法直接确定，并且可通过方法例如 Caceci 等人（1984，Byte 9：340-362）中所述的那些甚至对于复杂混合物进行计算。例如，可使用双重过滤硝化纤维素滤器结合测定如
35 Wong&Lohman（1993，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90：5428-5432）中公开的那种来确定 K_D 。评估抗体针对靶抗原的结合能力的其它标准测定是本领域已知的，包括例如 ELISA、蛋白质印迹、RIA 和流式细胞术分析、以及本公开其它地方例举的其它测定。抗体的结合动力学和结合亲和力也可通过本领域已知的标准测定，例

如表面等离子共振 (SPR)，例如通过使用 Biacore™ 系统或 KinExA 来评价。可通过比较各个抗体/抗原复合物的 K_D 值来比较与不同分子相互作用相关的结合亲和力，例如，不同抗体对于给定抗原的结合亲和力的比较。类似地，相互作用的特异性可通过确定和比较目的相互作用（例如抗体和抗原之间的特异性相互作用）的 K_D 值与非目的相互作用（例如已知不结合 CD40 的对照抗体）的 K_D 值进行评价。

术语“保守性置换”指置换为具有与原始氨基酸残基相似的特性的另一个氨基酸残基。例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有碱性侧链，并且天冬氨酸和谷氨酸具有相似的特性，在于它们具有酸性侧链。此外，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸和色氨酸具有相似的特性，在于它们具有不带电荷极性侧链，并且丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和甲硫氨酸具有相似的特性，在于它们具有非极性侧链。另外，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有芳族侧链。因此，本领域技术人员将显而易见，甚至当置换如上文所述的显示相似特性的组中的氨基酸残基时，它将不显示特性的特定变化。

“抑制”或“阻断”可互换使用，并涵盖部分和完全抑制/阻断这两者。对 CD40 的抑制/阻断优选地降低或改变无抑制或阻断的情况下发生 CD40 结合时出现活性的正常水平或类型。抑制和阻断也旨在包括与抗 CD40 抗体接触时，与未与抗 CD40 抗体接触的 CD40 相比，任何可测量的 CD40 结合亲和力降低。

“抑制生长”（例如涉及细胞）旨在包括细胞生长任何可测量的降低。

“激动活性”、“激动剂活性”或“激动性”指作为激动剂的功能。激动剂与细胞受体的结合引起了与该受体的天然配体所引起的相类似或相同的反应或活性。例如，CD40 激动剂可诱导任何或全部的下列应答：细胞增殖和/或分化；通过诸如 ICAM-1、E-选凝素、VCAM 等分子上调细胞之间的粘附；分泌促炎性细胞因子，例如 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNF 等；经 CD40 受体通过以下途径转导信号，例如 TRAF(例如，TRAF2 和/或 TRAF3)、MAP 激酶，如 NIK(NF- κ B 诱导激酶)、I- κ B 激酶(IKK α/β)、转录因子 NF- κ B、Ras 和 MEK/ERK 途径、PI3K/Akt 途径、P38 MAPK 途径等；通过 XIAP、Mcl-1、BCLx 等分子转导抗-凋亡信号；B 和/或 T 细胞记忆的产生；B 细胞抗体产生；B 细胞同种型转换；上调 II 类 MHC 和 CD80/86 的细胞表面表达等。“拮抗活性”、“拮抗剂活性”或“拮抗性”指可作为拮抗剂的物质的功能。例如，CD40 的拮抗剂可防止或降低通过 CD40 受体与激动性配体，具体是 CD40L 结合诱导的任何应答。拮抗剂可使激动剂结合所诱导的一种或多种应答降低 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、优选 40%、45%、50%、55%、60%、更优选 70%、80%、85% 和最优选 90%、95%、99% 或 100%。检测抗 CD40 抗体和 CD40 配体结合特异性与拮抗活性的方法是本领域技术人员已知的，包括但不限于标准的竞争性结合试验、监测 B 细胞分泌免疫球蛋白的试验、B 细胞增殖试验、Banchereau 样 B 细胞增殖试验、抗体产生的 T 细胞辅助试验、B 细胞增殖的共同刺激试验和上调 B 细胞激活标记的试验。

生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法在现有技术中熟知和能找到，如冷泉

港的抗体实验技术指南（5-8 章和 15 章）。如，可以用人 CD40 或其片段免疫小鼠或兔，所得到的抗体能被复性、纯化，并且可以用常规的方法进行氨基酸测序。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。本公开所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 区加上一个或多个人 FR 区。人 FR 种系序列可以从

5 ImMunoGeneTics (IMGT) 网站得到。

可使用本领域技术人员已知的常规技术，就与相同表位的结合竞争性筛选抗体。例如，可进行竞争和交叉竞争研究，以获得彼此竞争或交叉竞争与抗原结合的抗体。基于它们的交叉竞争来获得结合相同表位的抗体的高通量方法描述于国际专利公开 WO03/48731 中。因此，可使用本领域技术人员已知的常规技术，获得与本公开的抗体分子竞争结合 CD40 上的相同表位的抗体及其抗原结合片段。

术语“障碍”是将受益于使用本公开的人源化抗 CD40 抗体进行治疗的任何病症。这包括慢性和急性障碍或疾病。本公开要治疗的障碍的非限制性例子包括癌症、血液恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、白血病和淋巴样恶性肿瘤以及炎性障碍、血管生成障碍、自身免疫性障碍和免疫学障碍。

15 术语“CD40 相关障碍”或“CD40 相关疾病”是指其中指示表达 CD40 的细胞的修饰或消除的病症。这些细胞包括表现出异常增殖的表达 CD40 的细胞或与癌性或恶性生长相关联的表达 CD40 的细胞。表现出 CD40 抗原的异常表达的癌症的更具体例子包括 B 淋巴母细胞、伯基特氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、T 细胞淋巴瘤、卡波西氏肉瘤、骨肉瘤、表皮和内皮肿瘤、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、头颈癌、皮肤癌(黑色素瘤)、膀胱癌和肾癌。此类障碍包括但不限于白血病、淋巴瘤(包括 B 细胞淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特罗姆巨球蛋白血症；实体瘤，包括肉瘤，例如骨肉瘤、尤因氏肉瘤、恶性黑色素瘤、腺癌(包括卵巢腺癌)、卡波西氏肉瘤/卡波西氏肿瘤和鳞状细胞癌。“CD40 相关障碍”还包括免疫系统疾病和障碍，例如自身免疫性障碍和炎性障碍。此类病症包括但不限于类风湿性关节炎(RA)、全身性红斑狼疮(SLE)、硬皮病、舍格伦综合征、多发性硬化症、牛皮癣、炎症肠病(例如溃疡性结肠炎和克罗恩病)、肺部炎症、哮喘和特发性血小板减少性紫癜(ITP)。

25 术语“阻止...的生长”或“生长抑制”是指抑制细胞、尤其表达 CD40 抗原的增生性细胞类型的生长或增殖。因此，生长抑制例如显著降低了 S 期增生性细胞的百分比。

“给予”、“施用”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“给予”、“施用”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”、
35 “施用”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂，诸如包含本公开的任一种抗体

或其抗原结合片段或包含其的组合物，所述受试者已经患有、疑似患有、倾向于患有一种或多种疾病或其症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，无论是通过诱导这类症状退化还是抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。

- 5 有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如受试者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解某个受试者中目标疾病症状方面可能无效，但是
- 10 根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验（H 检验）、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

- “有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定受试者或兽医学受试者的有效量可依据以下
- 15 因素而变化：如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

- “同源性”或“同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同核苷酸或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被相同核苷酸占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100%的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源。一般而言，当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。
- 20

- 25 “细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括其后代。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。

- “任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如，“任选包含 1-3 个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。
- 30

- 本公开的“CD40 结合分子”以最大化解释，包含本公开的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，只要能够实现与 CD40 结合的蛋白均在该术语范围内。例如，CD40 结合蛋白可以包含一个或多个效应分子，以例如缀和的方式。所述“效应分子”
- 35 单独可以具有治疗活性（例如具有抗肿瘤活性或免疫激活或抑制活性）或具有检测功能，其可以是任何形式，例如生物活性蛋白（例如酶）、其它抗体或抗体片段、合成或天然存在的聚合物、多核苷酸及其片段例如 DNA、RNA 及其片段、放射性核素（特别地放射性碘化物）、放射性同位素、螯合金属、纳米颗粒和报道基团（例如荧光化合物）、或可通过 NMR 或 ESR 光谱分析检测的化合物。效应分子与本公

开抗 CD40 抗体或其抗原结合片段的缀和方式可以通过常规方法实现。

“抗体药物偶联物”是指将药物（例如抗肿瘤剂、毒素）连接至抗体上形成的偶联物，所述的偶联物可通过常规的方法连接，例如通过可裂解或不可裂解接头连接。

5

附图说明

图 1A 至 图 1B: CD40拮抗型抗体在报告基因系统中的活性结果，图1A和图1B分别是9E6-L4H2和2F12-L4H2的相关结果，图1A和图1B均使用人IgG1同种型作为阴性对照，CFZ533作为阳性对照。

10 图 2A 至 图 2B: CD40拮抗型抗体在B细胞激活实验体系中的抑制活性结果，图2A是9E6-L4H2和2F12-L4H2的CD19+CD69+的细胞百分比抑制结果，图2B是9E6-L4H2和2F12-L4H2的CD19+CD69+的细胞MFI抑制结果，图2A-图2B均使用人IgG1同种型作为阴性对照，CFZ533作为阳性对照。

15 图 3A 至 图 3D: CD40拮抗型抗体在DC细胞激活实验体系中的抑制活性结果，图3A是9E6-L4H2和2F12-L4H2的CD11C+CD80+的细胞MFI抑制结果，图3B是9E6-L4H2和2F12-L4H2的CD11C+CD86+细胞MFI抑制结果，图3C是9E6-L4H2和2F12-L4H2的抑制IL-12/23 p40的结果，图3D是9E6-L4H2和2F12-L4H2抑制TNF α 的结果，图3A-3D均使用人IgG1同种型作为阴性对照，CFZ533作为阳性对照。

20 图 4: CD40拮抗型抗体9E6-L4H2、2F12-L4H2在B细胞激活实验体系中的内源激活活性结果，使用人IgG1同种型、CFZ533、激动性抗CD40抗体9E5-SELFNS作为对照。

图 5A 至 图 5B: CD40拮抗型抗体在小鼠T细胞依赖的体液免疫反应模型中的活性结果，图5A为流程图，图5B为第7、14、21、28天的检测结果图。

25 图 6A 至 图 6B: CD40拮抗型抗体在小鼠皮肤移植排异模型中的活性结果，图6A为流程图，图6B为皮肤移植植物生存率（%）和皮肤移植植物评分结果。

图 7: CD40拮抗型抗体联用他克莫司（FK506）在小鼠皮肤移植排异模型中的活性结果，图7的A为9E6-L4H2（10mpk）及其与他克莫司（FK506）联用的皮肤移植植物生存率（%）结果，图7的B为2F12-L4H2（10mpk）及其与他克莫司（FK506）联用的皮肤移植植物生存率（%）结果，图7的C为9E6-L4H2（10mpk）及其与他克莫司（FK506）联用的皮肤移植植物评分结果，图7的D为2F12-L4H2（10mpk）及其与他克莫司（FK506）联用的皮肤移植植物评分结果。

30 图 8: CD40拮抗型抗体9E6-L4H2、2F12-L4H2在人CD40转基因小鼠中的PK检测结果，使用CFZ533作为对照。

35 图 9A 至 图 9B: Fc突变的CD40拮抗型抗体在B细胞激活实验体系中的抑制活性结果，图9A是9E6-L4H2和9E6-L4H2-AAYTE的CD19+CD69+的细胞MFI抑制结果，图9B是2F12-L4H2和2F12-L4H2-AAYTE的CD19+CD69+的细胞MFI抑制结果。

图 10A 至 图 10D: Fc突变的CD40拮抗剂在DC细胞激活实验体系中的抑制活性结果，图10A是9E6-L4H2和9E6-L4H2-AAYTE抑制IL-12/23 p40的结果，图10B

是9E6-L4H2和9E6-L4H2-AAYTE抑制TNF α 的结果，图10C是2F12-L4H2和2F12-L4H2-AAYTE抑制IL-12/23 p40的结果，图10D是2F12-L4H2和2F12-L4H2-AAYTE抑制TNF α 的结果。

5 具体实施方式

以下结合实施例用于进一步描述本公开，但这些实施例并非限制本公开的范围。

本公开实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，冷泉港实验室；当代分子生物学方法，Ausubel 等著，Greene 出版协会，Wiley Interscience, NY。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1. CD40 免疫抗原、筛选抗原的序列及制备

带 his 标签的人 CD40 (h-CD40-his)重组蛋白（货号 CD0-H5228）、带小鼠 Fc 标签的人 CD40 (h-CD40-mFc)重组蛋白（货号 CD0-H525a）、带 his 标签和生物素标签的人 CD40 (hCD40-his-avi)重组蛋白（货号 CD0-H82E8）和带 his 标签的食蟹猴 CD40 (cyno-CD40-his)重组蛋白（货号 CD0-C52H6）均为购买自 Acrobiosystems 公司的纯化商业蛋白试剂，其各自的序列来源见表 2。所述蛋白试剂可用于下述各实施例实验中。

20 表 2. 重组蛋白氨基酸序列来源

名称	氨基酸序列起止	GenBank 登录号
h-CD40-his	Glu21-Arg193	P25942-1
h-CD40-mFc	Glu21-Arg193	P25942-1
h-CD40-his-avi	Glu21-Arg193	P25942-1
cyno-CD40-his	Glu21-Arg193	G7PG38

实施例 2. 抗 CD40 兔单克隆抗体的筛选和人-兔嵌合抗体的制备

抗人 CD40 单克隆抗体通过免疫 2 只新西兰白兔产生。免疫抗原为带 His 标签的人 CD40 重组蛋白（h-CD40-his，用磷酸盐缓冲液配制成 1 μ g/ μ l）。用弗氏佐剂乳化：首次用弗氏完全佐剂(CFA)，其余加强免疫用弗氏不完全佐剂（IFA）。每次免疫采用多点皮下注射 400 μ g 抗原。免疫注射时间为第 0，7，20，41 天。于第 27 和 48 天采血进行血检，用 ELISA 和 FACS 方法检测兔子血清中的抗体滴度。选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平稳的兔子：第 63 天加强免疫，静脉注射 400 μ g/只的磷酸盐缓冲液配制的抗原溶液；第 67 天收集该兔子的脾脏，加入带有生物素标签的 CD40 抗原，用流式细胞仪分选被标记的单克隆 B 细胞至 96 孔板中。培养 14 天后，收集上清液，通过 ELISA 和 FACS 的方法筛选上清液可以结合人 CD40、食蟹猴 CD40 以及 Raji 细胞（表达人 CD40 的肿瘤细胞系）的克隆，一共 28 株 B 细胞单克隆。对这些单克隆细胞提取 RNA，反转录，进行 PCR 扩增后送测序公司测序，最终得到 28 株兔源抗体的序列，经亲和力、活性鉴定实验（方法参见实施例 2-3），筛选获得 11 株单抗，重链和轻链可变区序列如表 3 所示，CDR 序列如表

4 所示。

表 3. 抗 CD40 兔单克隆抗体可变区序列

编号	重链可变区和轻链可变区序列	
5A9	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLCTASRFSLSYDMSWVRQAPGNGLWIGAIGGA GGTYASWAKSRSTITRNTNLNTLTKMTSLTAADTATYFCARGWTRLDLWG QGLTVTVSS (SEQ ID NO:1)
	VL	ADIVLTQTASPVS GAVGGTVTINCQSSDISNLSWYQQKPGQPPKLLIYAASN LASGVPSRFKSGSGSGTEFTLTISDLECADAAATYYCQGGYWSGISNFGNGFGGG TEVVVK (SEQ ID NO:2)
9E6	VH	QSVRESEGGLVKPTDTLTLCTVSGFSLSSYDMSWVRQAPGNGLWIGAIGGA GGTYASWAKSRSTITRNTNLNTVTLKMSSLTAADTATYFCARGWTRLDLWG QGLTVTVSS (SEQ ID NO:3)
	VL	ADIVLTQTPSPVSGAVGGTVTIKQASEDISNLA WYQQKPGQPPKLLIFPASN ASGVSSRFKSGSGSGTEFTLTISDLECADAAATYYCQGGYWTSTSNFGNGFGGGT EVLVK (SEQ ID NO:4)
9F10	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLCTVSGFSLSSYDMSWVRQAPGNGLWIGAIGGA GGTYASWAKSRSTITRNTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARGWTRLDLWG QGLTVTVSS (SEQ ID NO:5)
	VL	ADIVLTQTESPVSGPVGGTVTINCQASEDISNLA WYQQKPGQPPKLLIYAASN LASGVPSRFKSGSGSGTEFTLTISDLECADAAATYYCQGGYWSSTSYFNGFGGG TQVVVK (SEQ ID NO:6)
4F6	VH	QSVKESEGGLFKPADTLTLCTVSRFSLSYGVTVWRQAPGNGLWIGAIGST GSAYASWAKSRSTITRDTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARGGITAYAIWGP GTLTVTVSS (SEQ ID NO:7)
	VL	AFELTQTPSSVEAAVGGTVTIKQASQISNGLAWYQQKPGQPPKLLIAGASN ASGVSSRFKSGSGSGIEFTLTISDLECADAAATYYCQSYYSNFTTVFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:8)
5B8	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLCTVSGFSLNSYGVSWVRQAPGNGLWIGAIGSS GSAYASWAKSRSTITRDTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARGGITVYAIWG PGLTVTVSS (SEQ ID NO:9)
	VL	AFELTQTPSPVSAAVGGTVTINCQASEDITNGIA WYQQKPGQPPKLLIAGASN ASGVSSRFKSGSGSGTEFTLTISDLECDAAATYYCQSYYSSTYIFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:10)
8G10	VH	QSVKESEGGLFKPTATLTLCTVSGFSLSSYGVSWVRQAPGSGLEWIGGIASGT TTYANWAKSRSTITRDTNLKTVTLKMTSLTAADTATYFCARGGITAYAIWGP GTLTVTVSS (SEQ ID NO:11)
	VL	AFELTQTPSSVEAAVGGTVTIKQASQISNGLAWYQQKPGQPPKLLIAGASN LASGVSSRFKSGSGSGTEFTLTISDLECADAAATYYCQSYDSSSTVFGGGTEVV K (SEQ ID NO:12)
8C12	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLCTVSGFSLSSYGVSWVRQAPGNGLWIGGIGSD GSAYASWAKSRATITRDTNLKTVTLEMTSLTVADTATYFCARGGITVYAIWGP GTLTVTVSS (SEQ ID NO:13)
	VL	AFELTQTPSPVSAAVGGTVTIKQASQISNGLAWYQQKPGQPPKVLIVGASN LASGVSSRFKSGSGSGTEFTLSISDLECADGATYYCQSYFSSSTVFGGGTEVV K (SEQ ID NO:14)
4D4	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLCTVSGFSLSSYGVSWVRQAPGNGLWIGGIGSD GSAYASWAKSRATITRDTNLKTVTLEMTSLTAADTATYFCARGGITVYAIWG PGLTVTVSS (SEQ ID NO:15)
	VL	AFELTQTPSPVSAAVGGTVTIKQASQISNGLAWYQQKPGQPPKVLIVGASN LASGVSSRFKSGSGSGTEFTLSISDLECADGATYYCQSYFSSSTVFGGGTEVV K (SEQ ID NO:16)
2F12	VH	QSVKESEGGLFKPKDTLTLCTVSGFSLSSYGVSWVRQAPGNGLWIGGIGSD GSAYASWAKSRATITRDTNLKTVTLEMTSLTAADTATYFCARGGITVYAMW GPGLTVTVSS (SEQ ID NO:17)

	VL	AFELTQTPASVEAAMGGT ~~VTIKCQASQ~~ SISNGLAWYQQKPGQPPKLLIVGASN LASGVSSRFKSGSGSTEFTLSISDLECADGATYYCQSYFSSSTVFGGGTEVVV K (SEQ ID NO:18)
3F6	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLCTVSGFSLSSYAISWVRQAPNGLEWIG ~~AIDRYG~~ TTYATWAKSRSTITRNTNENTVTLKMTSLTAADTATYFCARGPWYYGGDVA WTGSFDPWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:19)
	VL	AQVLTQTASPVSAAVGGT ~~VTISCQSSQSVAN~~ DFLSWYQQKPGQPPKLLIYGA STLASGVPSRFRGNGSGTQFTLTITGMQCDDAATYFCTGGYAGPIYIFGGGTEV VVK (SEQ ID NO:20)
10A4	VH	QSLEESGGRLVTPGGSLTLCTVSGIDLSRNAISWVRQSPNGLEWIGGIGSSGS A ~~YYASWAKSRSTITR~~ DTNLTNTVTLKMTSLTAADTATYFCARDGYAGSSWGIYY GMDPWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:21)
	VL	AIEMTQSPPSLSASVGETVRIRCLASEDIYRGISWYQQKPGKPPTLLIYGASTLQ SGVPPRFSGSGSGTDYTLTIGGVQAEDAATYYCLGGHSYSSAGLTFGAGTKVE IK (SEQ ID NO:22)

(注：下划线为重轻链可变区的 CDR 区，使用 Kabat 编号规则确定)

表 4. 抗 CD40 兔单克隆抗体的 CDR 区 (Kabat 编号规则)

编号	重链 CDR		轻链 CDR	
5A9	HCDR1	SYDMS (SEQ ID NO:23)	LCDR1	QSEDISSNLS (SEQ ID NO:26)
	HCDR2	AIGGAGGTYIASWAKS (SEQ ID NO:24)	LCDR2	AASNLAS (SEQ ID NO:27)
	HCDR3	GWTRLDL (SEQ ID NO:25)	LCDR3	QGGYWSGISNFGNG (SEQ ID NO:28)
9E6	HCDR1	SYDMS (SEQ ID NO:23)	LCDR1	QASEDISSNLA (SEQ ID NO:29)
	HCDR2	AIGGAGGTYIASWAKS (SEQ ID NO:24)	LCDR2	PASNLAS (SEQ ID NO:30)
	HCDR3	GWTRLDL (SEQ ID NO:25)	LCDR3	QGGYWTSTSNFGNG (SEQ ID NO:31)
9F10	HCDR1	SYDMS (SEQ ID NO:23)	LCDR1	QASEDISSNLA (SEQ ID NO:29)
	HCDR2	AIGGAGGTYIASWAKS (SEQ ID NO:24)	LCDR2	AASNLAS (SEQ ID NO:27)
	HCDR3	GWTRLDL (SEQ ID NO:25)	LCDR3	QGAYWSSTSYFGNG (SEQ ID NO:32)
4F6	HCDR1	SYGVT (SEQ ID NO:33)	LCDR1	QASQISNGLA (SEQ ID NO:36)
	HCDR2	AIGSTGSAYIASWAKS (SEQ ID NO:34)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:37)
	HCDR3	GGITAYAI (SEQ ID NO:35)	LCDR3	QSYNSFTTV (SEQ ID NO:38)
5B8	HCDR1	SYGVS (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASEDITNGIA (SEQ ID NO:42)
	HCDR2	AIGSSGSAYIASWARS (SEQ ID NO:40)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:37)
	HCDR3	GGITVYAI (SEQ ID NO:41)	LCDR3	QSYSSSYTI (SEQ ID NO:43)
8G10	HCDR1	SYGVS (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASQISNGLA (SEQ ID NO:45)
	HCDR2	GIASGTGTYIANWAKS (SEQ ID NO:44)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:37)
	HCDR3	GGITAYAI (SEQ ID NO:35)	LCDR3	QSYDSSSTV (SEQ ID NO:46)
8C12	HCDR1	SYGVS (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASQISNGLA (SEQ ID NO:36)

	HCDR2	GIGSDGSAYYASWAKS (SEQ ID NO:47)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:37)
	HCDR3	GGITVYAI (SEQ ID NO:41)	LCDR3	QSYFSSSSTV (SEQ ID NO:48)
4D4	HCDR1	SYGVS (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASQISNGLA (SEQ ID NO:36)
	HCDR2	GIGSDGSAYYASWAKS (SEQ ID NO:47)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:37)
	HCDR3	GGITVYAI (SEQ ID NO:41)	LCDR3	QSYFSSSSTV (SEQ ID NO:48)
2F12	HCDR1	SYGVS (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASQISNGLA (SEQ ID NO:36)
	HCDR2	GIGSDGSAYYASWAKS (SEQ ID NO:47)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:50)
	HCDR3	GGITVYAM (SEQ ID NO:49)	LCDR3	QSYFSSSSTV (SEQ ID NO:48)
3F6	HCDR1	SYAIS (SEQ ID NO:51)	LCDR1	QSSQSVANNDFLS (SEQ ID NO:54)
	HCDR2	AIDRYGTTYATWAKS (SEQ ID NO:52)	LCDR2	GASTLAS (SEQ ID NO:55)
	HCDR3	GPWYYGGDVAWTGSFDP (SEQ ID NO:53)	LCDR3	TGGYAGPIYI (SEQ ID NO:56)
10A4	HCDR1	RNAIS (SEQ ID NO:57)	LCDR1	LASEDIYRGIS (SEQ ID NO:60)
	HCDR2	GIGSSGSAYYASWAKS (SEQ ID NO:58)	LCDR2	GASTLQS (SEQ ID NO:61)
	HCDR3	DGYAGSSWGIYYGMDP (SEQ ID NO:59)	LCDR3	LGGHSYSSAGLT (SEQ ID NO:62)

将获得的可变区序列分别接上人的抗体 IgG1 恒定区（带有 N297A 突变，Eu 编号系统）序列和人 kappa 链恒定区序列，得到人-兔嵌合抗体序列，利用分子克隆技术，把嵌合抗体的序列插入到表达载体中，利用 HEK293 细胞表达系统，即可获得人-兔嵌合抗体。

实施例 3. 人-兔嵌合抗 CD40 抗体 Raji 细胞结合实验

Raji 细胞是过表达人 CD40 的肿瘤细胞系。将数量为 2E5 的 Raji 细胞接种到 96 孔板上。加入 100 μ L 待测抗体，最高终浓度为 100 nM，5 倍稀释，一共 8 个浓度，4℃孵育 1 小时。用洗液洗一遍，按 1:500 的稀释度加入偶联了 AF647 的抗人 IgG 抗体（Jackson Immunoresearch Laboratories, 货号 205-609-088），4℃孵育 30 分钟。用洗液洗一遍，流式细胞仪读取荧光强度。计算抗 CD40 抗体对 CD40 的结合 EC₅₀ 值。使用抗 CD40 拮抗型抗体 CFZ533（即，Iscalimab, Nova）作为阳性对照，重链和轻链可变区序列分别来源于 US8277810B 的序列 5 和序列 2。

表 5 结果显示，2F12、3F6、4F6、5A9、5B8、9E6、10A4 均具有强于 CFZ533 的结合 EC₅₀，而以 8E1（序列未出示）为例的其他抗体的 EC₅₀ 则弱于 CFZ533。

表 5. 人-兔嵌合抗 CD40 抗体对 Raji 细胞的 FACS 结合 EC₅₀ (nM)

编号	结合 EC ₅₀ (nM)
2F12	0.412
3F6	1.506

4F6	0.258
5A9	0.671
5B8	0.435
8E1	2.511
9E6	0.608
10A4	0.467
CFZ533	2.410

实施例 4 人-兔嵌合抗 CD40 抗体报告基因细胞活性实验

HEK-Blue CD40L 细胞购自 Invivogen (Cat#hkb-cd40)，该细胞稳定转染了人 CD40 基因和 NF- κ B 介导的 SEAP 基因组，可以通过 SEAP 底物 QUANTI-Blue 检测上清中分泌的 SEAP 来表征 CD40 信号通路的活化水平。本实验通过检测 CD40L 对细胞 HEK-Blue CD40L 的活化，根据 IC₅₀ 大小评价抗 CD40 抗体的体外拮抗剂活性。细胞 HEK-Blue CD40L 培养在含 10% FBS，100 μ g/mL Zeocin 和 30 μ g/mL Blasticidin 的 DMEM 培养基中，一周传代 2~3 次，传代比例 1:5 或 1:10。传代时，吸掉培养基，用 5mL 0.25% 的胰酶冲洗细胞层，然后吸掉胰酶，将细胞放在培养箱中消化 3~5 分钟，加入新鲜培养基重悬细胞。在 96 孔细胞培养板中加入 100 μ L 的细胞悬液，密度为 5×10^5 细胞/mL，培养基为含 10% FBS，100 μ g/mL Zeocin 和 30 μ g/mL Blasticidin 的 DMEM，96 孔板外围只加入 100 μ L 无菌水。将培养板在培养箱培养 24 小时 (37 $^{\circ}$ C，5% CO₂)。细胞贴壁后，每孔加入 100 μ L 梯度稀释的待测抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。加入 25 ng/mL CD40L (R&D，货号 2706-CL) 和 2 μ g/mL anti-His 抗体 (R&D，货号 MAB050)，将培养板在培养箱孵育 20-24 小时 (37 $^{\circ}$ C，5% CO₂)。每孔取 20 μ L 细胞上清到一个新的 96 孔平底板中，加入 180 μ L QUANTI-Blue 底物溶液，将培养板在培养箱内避光孵育 1-3 小时。用酶标仪 (Thermo MultiSkanFc) 测定在 630 nm 处的吸光度，计算 IC₅₀ 值评价抗 CD40 抗体的体外细胞活性。参见表 6，结果显示 2F12、3F6、4D4、4F6、5A9、5B8、8C12、8G10、9E6、9F10、10A4 均具有与 CFZ533 相当或略强的报告基因细胞抑制活性 IC₅₀，而以 2F1 (序列未出示) 为例的其他抗体的 IC₅₀ 则弱于 CFZ533。

表 6. 抗 CD40 抗体报告基因细胞活性 IC₅₀ (nM)

编号	IC ₅₀ (nM)
2F12	0.1717
3F6	0.3778
4D4	0.197
4F6	0.1823
5A9	0.3173
5B8	0.2033
8C12	0.1729

8G10	0.1556
9E6	0.2206
9F10	0.2171
10A4	0.2172
2F1	0.6849
CFZ533	0.2715

实施例 5. 抗 CD40 抗体的人源化

将兔源抗体 2F12、3F6、9E6 和 10A4 的重、轻链可变区序列与抗体 GermLine 数据库比较，获得同源性高的人种系模板。最终抗体进行人源化的人种系模板信息参见表 7。

表 7. 抗体人源化过程的人种系模板信息

编号	重链可变区		轻链可变区	
	FR1-FR3	FR4	FR1-FR3	FR4
2F12	IGHV2-26*01	IGHJ1*01	IGkV1-13*02	IGKJ4*01
3F6	IGHV4-30-4*02		IGkV1-13*02	
9E6	IGHV4-30-4*02		IGkV1-9*01	
10A4	IGHV4-4*08		IGkV1-6*01	

将兔源抗体的 CDR 区移植到选择的人种系模板上，替换人种系可变区，再与相应的人源 IgG 恒定区（优选重链为带有 N297A 突变的 IgG1，轻链为 κ）重组。然后以兔源抗体的三维结构为基础，对包埋残基、与 CDR 区有直接相互作用的残基，以及对 VL 和 VH 的构象有重要影响的残基进行回复突变，并对潜在的翻译后修饰风险点进行突变，得到最终的人源化分子。实例性出示 2F12 和 9E6 对应的人源化轻、重链可变区序列（参见表 8、表 9），其中 L 代表轻链，H 代表重链，L 和 H 后的数字代表包含不同回复突变的不同版本的人源化序列。

表 8. 人源化的 9E6 的重、轻链可变区序列

重、轻链可变区序列		序列编号
9E6-L1	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQASEDISSNLAWYQQKPGKPPKLLIFPASNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQGGYWTSTSNFGNVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:63
9E6-L2	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQASEDISSNLAWYQQKPGKPPKLLIFPASNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQGGYWTSTSNFGSGFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:64
9E6-L3	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQASEDISSNLAWYQQKPGKPPKLLIFPASNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQGGYWTSTSNFGTGFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:65
9E6-L4	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQASEDISSNLAWYQQKPGKPPKLLIFPASNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQGGYWTSTSNFGQGFSGGGTKVEIK	SEQ ID NO:66
9E6-H1	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWIRQPPGKGLEWIGAIGGAGGTYYASWAKSRVTISVDTSLNQVSLKLSVTAADTAVYYCARGWTRLDLWGQGLTVTVSS	SEQ ID NO:67

9E6-H2	QVQVQESGPGVLKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWIRQPPGKG LEWIGAIGGAGGTYIASWAKSRVTISVDTSLNQVSLKLSSTVAA DTAVYYCARGWTRLDLWGQGTLLVTSS	SEQ ID NO:68
--------	---	--------------

(下划线为 Kabat 编码规则的 CDR。)

9E6 在人源化的过程中, 获得了如下的 LCDR3:

>9E6-L1 的 LCDR3

QGGYWTSTSNFGNV (SEQ ID NO:69)

>9E6-L2 的 LCDR3

QGGYWTSTSNFGSG (SEQ ID NO:70)

>9E6-L3 的 LCDR3

QGGYWTSTSNFGTG (SEQ ID NO:71)

>9E6-L4 的 LCDR3

QGGYWTSTSNFGQG (SEQ ID NO:72)

>9E6-L 的 LCDR3 通式

QGGYWTSTSNFGX₉X₁₀ (SEQ ID NO:73), 其中, X₉ 选自 N、S、T 或 Q,

X₁₀ 选自 V 或 G。

5A9、9E6、9F10 具有如下的通式结构:

15 HCDR1、HCDR2、HCDR3 分别如 SYDMS(SEQ ID NO:23)、AIGGAGGTYIASWAKS(SEQ ID NO:24)、GWTRLDL(SEQ ID NO:25)所示;

LCDR1 如 QX₁SEDISSNLX₂(SEQ ID NO:74)所示, 其中, X₁ 选自 A 或 S, X₂ 选自 A 或 S;

LCDR2 如 X₃ASNLAS(SEQ ID NO:75)所示, 其中, X₃ 选自 A 或 P;

20 LCDR3 如 QGX₄YWX₅X₆X₇SX₈FGX₉X₁₀(SEQ ID NO:76)所示, 其中, X₄ 选自 A 或 G, X₅ 选自 S 或 T, X₆ 选自 S 或 G, X₇ 选自 T 或 S, X₈ 选自 N 或 Y, X₉ 选自 N、S、T 或 Q, X₁₀ 选自 V 或 G。

表 9. 人源化的 2F12 的重、轻链可变区序列

重、轻链可变区序列		序列编号
2F12-L1	AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQISNVLAWYQQKPGKPP KLLIVGASNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ SYFSSSTVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:77
2F12-L2	AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQISQGLAWYQQKPGKPP KLLIVGASNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ SYFSSSTVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:78
2F12-L3	AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQISSGLAWYQQKPGKPP KLLIVGASNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ SYFSSSTVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:79
2F12-L4	AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQISITGLAWYQQKPGKPP KLLIVGASNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ SYFSSSTVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:80
2F12-H1	EVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKAL EWLAGIGSDGSAYYASWAKSRLTISRDTNLKQVVLMTNMDPV DTATYYCARGGITVYAMWGQGTLLVTSS	SEQ ID NO:81
2F12-H2	EVTVKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKA LEWLGGIGSDGSAYYASWAKSRLTISRDTNLKQVVLMTNMDP	SEQ ID NO:82

	VDTATYYCARGGITVYAMWGQGLTVTVSS	
--	-------------------------------	--

(下划线为 Kabat 编码规则的 CDR。)

2F12 在人源化的过程中, 获得了如下的 LCDR1:

>2F12-L1 的 LCDR1

QASQSI⁵SNVLA (SEQ ID NO:83)

>2F12-L2 的 LCDR1

QASQSI⁵SQGLA (SEQ ID NO:84)

>2F12-L3 的 LCDR1

QASQSI⁵SSGLA (SEQ ID NO:85)

>2F12-L4 的 LCDR1

10 QASQSI⁵STGLA (SEQ ID NO:86)

>2F12-L 的 LCDR1 通式

QASQSI⁵SX₂₄X₂₅LA (SEQ ID NO:87), 其中, X₂₄ 选自 N、Q、S 或 T, X₂₅ 选自 V 或 G。

4F6、5B8、8G10、8C12、4D4、2F12 具有如下的通式结构:

15 HCDR1 如 SYGVX₁₁ (SEQ ID NO:88)所示, 其中, X₁₁ 选自 S 或 T;

HCDR2 如 X₁₂IX₁₃SX₁₄GX₁₅X₁₆YYAX₁₇WAX₁₈S (SEQ ID NO:89)所示, 其中, X₁₂ 选自 A 或 G, X₁₃ 选自 G 或 A, X₁₄ 选自 T、S 或 D, X₁₅ 选自 T、S, X₁₆ 选自 T、A, X₁₇ 选自 S、N, X₁₈ 选自 K 或 R;

20 HCDR3 如 GGITX₁₉YAX₂₀ (SEQ ID NO:90)所示, 其中, X₁₉ 选自 A 或 V, X₂₀ 选自 I 或 M;

LCDR1 如 QASX₂₁X₂₂IX₂₃X₂₄X₂₅LA (SEQ ID NO:91)所示, 其中, X₂₁ 选自 Q 或 E, X₂₂ 选自 S 或 D, X₂₃ 选自 S 或 T, X₂₄ 选自 N、Q、S 或 T, X₂₅ 选自 V 或 G。

LCDR2 如 GASNLAS (SEQ ID NO:37)所示;

25 LCDR3 如 QSYX₂₆X₂₇SX₂₈X₂₉TX₃₀ (SEQ ID NO:92)所示, 其中, X₂₆ 选自 F 或 Y, X₂₇ 选自 S、D 或 N, X₂₈ 选自 S 或 F, X₂₉ 选自 S、T 或 Y, X₃₀ 选自 V 或 I。

在每个兔抗的人源化各版本轻、重链之间进行两两组合、表达和纯化。命名规则为重链和轻链可变区编号的组合, 例如“2F12-L1H1”即是 VH 选择 SEQ ID NO:63, VL 选择 SEQ ID NO:67 的抗体。轻、重链恒定区分别采用人 IgG1 恒定区 (带有 N297A 突变, Eu 编号系统) 序列和人 kappa 链恒定区序列。

30 示例性的人源化分子 2F12-L4H2 (使用 2F12-L4 轻链和 2F12-H2 重链) 和 9E6-L4H2 (使用 9E6-L4 轻链和 9E6-H2 重链) 序列如下, 其轻、重链恒定区分别采用人 IgG1 恒定区 (带有 N297A 突变, Eu 编号系统) 序列和人 kappa 链恒定区序列。

>9E6-L4H2 HC:

35 QVQVQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWIRQPPGKGLEWIGAIG
GAGGTYIASWAKSRVTISVDTSLNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGWTRLDLW
GQGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
40 PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHODWLNGLNGKEYKCK

VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:93

>9E6-L4H2 LC:

5 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQASEDISSNLAWYQQKPGKPPKLLIFPASN
 LASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQGGYWTSTSNFGQGGGK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREKQWQKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC SEQ ID NO:94

10 >2F12-L4H2 HC:

EVTVKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKALEWLGGIG
 SDGSAYYASWAKSRLTISRDTNLKQVVLMTNMDPVDATYYCARGGITVYAM
 WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
 15 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:95

20 >2F12-L4H2 LC:

AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISTGLAWYQQKPGKPPKLLIVGAS
 NLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSYFSSSSTVFGGKTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREKQWQKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 25 SEQ ID NO:96

对上述抗体的重链恒定区进行改造，抗体采用人 IgG1 恒定区，带有 L234A，
 L235A，M252Y，S254T 和 T256E（Eu 编号系统）5 个点突变，轻链恒定区以及
 轻、重链可变区保持不变。新产生的抗体为 2F12-L4H2-AAYTE 和
 9E6-L4H2-AAYTE，其完整重链序列如下所示：

30 >9E6-L4H2-AAYTE HC:

QVQVQESGPGVLKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWIRQPPGKGLEWIGAIG
 GAGGTYIASWAKSRVTISVDTSLNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGWTRLDLW
 GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
 35 PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:97

40 >2F12-L4H2-AAYTE HC:

EVTVKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKALEWLGGIG
 SDGSAYYASWAKSRLTISRDTNLKQVVLMTNMDPVDATYYCARGGITVYAM
 WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
5 EALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:98
以上下划线区为重链或轻链恒定区。
实例性的 IgG Fc 如下所示：
> IgG1-Fc(N297A)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
10 TFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
15 KSLSLSPGK SEQ ID NO:99
> IgG1-Fc(AAYTE)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
20 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK SEQ ID NO:100

25 实施例 6. 人源化抗 CD40 抗体 Raji 细胞结合实验

Raji 细胞表面高表达人 CD40，可用于检测 CD40 拮抗型抗体与细胞表面人 CD40 的结合特性。

将 Raji 以 1.5E5/孔铺板，加入不同浓度的 CD40 拮抗型抗体，4 度孵育 1 小时。FACS 缓冲液（PBS+2% FBS）洗涤两遍后，加入二抗（Alexa Flour488 偶连的抗人 IgG(H+L)抗体），4 度孵育 0.5 小时。FACS 缓冲液洗涤两遍后，流式细胞仪（BD FACS Celesta）检测细胞表面的荧光强度。

30 结果如表 10 所示，其中 2F12-L4H2、9E6-L4H2 和 CFZ533 与 Raji 表面的人 CD40 有相似的结合能力。

表 10. 人源化抗 CD40 抗体对 Raji 细胞的 FACS 结合 EC₅₀ 结果

抗体编号	结合 EC ₅₀ (nM)	抗体编号	结合 EC ₅₀ (nM)
2F12	0.479	9E6	0.895
2F12-L1H1	0.549	9E6-L1H1	1.083
2F12-L1H2	0.469	9E6-L1H2	1.048
2F12-L2H1	0.516	9E6-L2H1	1.993
2F12-L2H2	0.516	9E6-L2H2	1.660

2F12-L3H1	0.456	9E6-L3H1	1.065
2F12-L3H2	0.762	9E6-L3H2	1.148
2F12-L4H1	0.508	9E6-L4H1	0.928
2F12-L4H2	0.589	9E6-L4H2	0.870
CFZ533	1.009		

实施例 7. 抗 CD40 抗体与人 CD40 和食蟹猴 CD40 的亲合力测定

5 将待测抗体亲和捕获在抗人 Fc 的芯片上，然后于芯片表面流经一系列浓度梯度下的带有 His 标签的人或食蟹猴 CD40 抗原，利用 Biacore 仪器实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线。实验中用到的缓冲液为 HBS-EP+ 10×缓冲溶液(Cat. # BR-1006-69, GE)，用 D. I. Water 稀释至 1× (pH 7.4)。实验得到的数据以 (1:1) Binding 模型进行拟合，得出亲和力数值，见表 11。

9E6-L4H2、2F12-L4H2 相比 CFZ533 与人 CD40 有相似的结合常数，9E6-L4H2 与食蟹猴 CD40 的结合亲和力较强，2F12-L4H2 与食蟹猴 CD40 的结合亲和力略弱。

10 表 11. CD40 拮抗型抗体与不同种系 CD40 的 SPR 亲合力

流动相	固定相	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
人 CD40	2F12-L4H2	7.58E+05	2.06E-03	2.71E-09
	9E6-L4H2	4.13E+05	2.21E-04	5.36E-10
	CFZ533	6.88E+05	1.41E-04	2.05E-10
食蟹猴 CD40	2F12-L4H2	1.17E+07	4.14E-01	3.53E-08
	9E6-L4H2	5.14E+05	6.23E-05	1.21E-10

实施例 8. 抗 CD40 抗体报告基因细胞活性实验

15 HEK-Blue CD40L 细胞购自 Invivogen (Cat# hkb-cd40)，该细胞稳定转染了人 CD40 基因和 NF-kB 介导的 SEAP 基因组，可以通过 SEAP 底物 QUANTI-Blue 检测上清中分泌的 SEAP 含量来表征 CD40 信号通路的活化水平。本实验通过检测 CD40 拮抗型抗体对 CD40L 诱导的 HEK-Blue CD40L 细胞活化的抑制作用，根据 IC₅₀ 大小评价 CD40 拮抗型抗体的体外细胞活性。

20 HEK-Blue CD40L 细胞培养在含 10% FBS，100 µg/ml Normocin，100 µg/ml Zeocin 和 30 pg/ml Blasticidin 的 DMEM 培养基中，一周传代 2~3 次。将 HEK-Blue CD40L 细胞以 5E4/孔铺入 96 孔细胞培养板(培养基为 DMEM, 10% FBS, 100 µg/ml Normocin)，培养过夜。细胞贴壁后，每孔加入 100µL 梯度稀释的待测抗体，37℃ 孵育 1 小时。加入 CD40L-his (R&D, 2706-CL-025) 和抗 His 抗体 (R&D, MAB050-500)，过夜培养。将细胞离心，转移 20 µL 细胞上清到一个新的 96 孔白

25 板中，加入 180µL QUANTI-Blue 底物溶液，避光孵育 15 分钟，用 Envision 酶标仪测定在 620 nm 处的吸光度，计算 IC₅₀ 值评价 CD40 拮抗型抗体的体外细胞活性。

结果如表 12 和图 1A 至图 1B 所示，9E6-L4H2 和 CFZ533 对报告基因系统具有相似的抑制活性，2F12-L4H2 的抑制活性比 CFZ533 更优。

表 12. 抗 CD40 抗体对 CD40 报告基因细胞活性抑制 IC₅₀

	抗体编号	IC ₅₀ (nM)
实验 1	2F12-L4H2	0.18
	CFZ533	0.36
实验 2	9E6-L4H2	0.50
	CFZ533	0.35

实施例 9. 抗 CD40 抗体在 B 细胞激活实验体系中的抑制活性

5 CD40 高表达于 B 细胞，CD40L 结合 CD40 后可诱导 B 细胞活化，上调一系列激活标志物的表达。CD40 拮抗型抗体通过阻断 CD40L 与 CD40 的结合，解除 B 细胞的免疫激活过程。

将人 PBMC 以 2E5/孔，每孔 50 μL 铺入 96 孔细胞培养板(培养基为 RPMI-1640，10% FBS, 1%青霉素-链霉素)。每孔加入 50 μL 梯度稀释的待测抗体，37℃，5%CO₂ 条件共孵育 0.5 小时。每孔加入 CD40L-his 和抗 His 抗体，刺激过夜。第二天离心去除上清，细胞用 FACS 缓冲液洗涤两遍，加入 100 μL 1:1000 稀释的 Fixable viability dye EF780 (Invitrogen, 65086514) 室温染色 15 分钟。细胞洗涤两遍后加入 100 μL 1:200 稀释的人 Fc 封闭剂 (Fc blocker, BD, 564220) 室温封闭 10 分钟。离心细胞后加入 1: 200 稀释的流式抗体 (PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD19 (Biolegend, 302230), APC anti-human CD69 (Biolegend, 310910))，4℃孵育 0.5 小时。离心去除上清，细胞用 FACS 缓冲液洗涤两遍后，用 200 μL PBS 重悬细胞，流式细胞仪 (BD FACS Celesta) 检测细胞表面的荧光强度。

15 结果如表 13 和图 2A 至图 2B 所示，9E6-L4H2 相比 CFZ533 具有相似的 B 细胞激活抑制活性。2F12-L4H2 的 B 细胞抑制活性强于 CFZ533。

20 表 13. 人源化抗 CD40 抗体在 B 细胞激活实验体系中的抑制活性

	CD19+CD69+%		CD19+CD69+ MFI	
抗体编号	IC ₅₀ (nM)	最大抑制率	IC ₅₀ (nM)	最大抑制率
CFZ533	0.14	95%	0.07	110%
9E6-L4H2	0.14	98%	0.07	110%
2F12-L4H2	0.04	93%	0.03	111%

加入抗体后，CD19+CD69+信号低于本底值，可能是因为一定程度抑制了 B 细胞的本底激活 (除抑制 CD40L 诱导的信号外)。

实施例 10. 抗 CD40 抗体在 DC 细胞激活实验体系中的抑制活性

25 CD40 在树突状细胞 (Dendritic Cell, DC) 上高表达，CD40L 结合 CD40 后可诱导 DC 活化，上调 DC 细胞表面多个激活标志物的表达，并促进 DC 分泌多种炎症因子，进一步扩大免疫反应。CD40 拮抗型抗体通过阻断 CD40L 与 CD40 的结

合，解除 DC 细胞的免疫激活过程。

使用 EsaySep™ 人 CD14 分选试剂盒 (Stemcell, 19359) 从新鲜原代人外周血 PBMC 中分选并富集单核细胞，用 RPMI-1640 培养基 (10% FBS, 1%青霉素-链霉素)，50 ng/ml IL-4 (PeproTech, 200-04) 和 50 ng/ml GM-CSF (PeproTech, 300-03) 分化 6 天。第 7 天时将分化完成的 DC 细胞以 1E5/孔铺入 96 孔细胞培养板。每孔加入梯度稀释的待测抗体，37℃，5% CO₂ 条件共孵育 0.5 小时。每孔再加入终浓度为 CD40L-his 和抗 His 抗体。培养 48 小时后流式检测 DC 细胞的激活水平：离心去除上清，细胞用 FACS 缓冲液 (PBS+2% FBS) 洗涤两遍，加入 100 μL 1:1000 稀释的 Fixable viability dye EF780 (Invitrogen, 65086514) 室温染色 15 分钟。细胞洗涤两遍后加入 100 μL 1:200 稀释的人 Fc 封闭 (BD, 564220) 室温封闭 10 分钟。离心细胞后加入 1: 200 稀释的流式抗体 (Alexa Fluor® 700 anti-human CD11c (Biolegend, 337220), Brilliant Violet 421™ anti-human CD80 (Biolegend, 305221), APC anti-human CD86 (Biolegend, 305412)), 4℃孵育 0.5 小时。离心去除上清，细胞用 FACS 缓冲液洗涤两遍后，用 200 μL PBS 重悬细胞，流式细胞仪 (BD FACS Celesta) 检测细胞表面的荧光强度。

此外，分别于培养 24 小时 (TNFα, Cisbio, 62HTNFAPEG) 和 48 小时 (IL-12/23 p40, Novus, VAL121) 后检测上清中细胞因子的分泌水平。

实验结果如表 14 和图 3A 至图 3D 所示，9E6-L4H2 和 2F12-L4H2 具有与对照抗体 CFZ533 相似的 DC 细胞抑制活性。

表 14. 人源化抗 CD40 抗体在 DC 细胞激活实验体系中的抑制活性

抗体编号	DC 细胞激活实验体系的 IC ₅₀ (nM)			
	CD80 MFI	CD86 MFI	IL-12/23 p40	TNFα
CFZ533	1.19	1.93	0.68	0.35
9E6-L4H2	3.44	3.72	1.85	0.7
2F12-L4H2	0.78	0.52	0.68	0.30

实施例 11. 人源化抗 CD40 抗体在 B 细胞激活实验体系中的激动活性

CD40 属于 TNF 超家族受体，在结合配体 CD40L 或被抗体交联后可介导下游信号通路的特异和非特异性激活，因此在不加入 CD40L 条件下可检测 CD40 拮抗型抗体对 B 细胞的本底激动剂活性。

将人 PBMC 以 2E5/孔，每孔 100 μL 铺入 96 孔细胞培养板 (培养基为 RPMI-1640, 10% FBS, 1%青霉素-链霉素)。每孔加入 100 μL 梯度稀释的待测抗体，37℃，5% CO₂ 培养过夜。第二天离心去除上清，细胞用 FACS 缓冲液洗涤两遍，加入 100 μL 1:1000 稀释的 Fixable viability dye EF780 室温染色 15 分钟。细胞洗涤两遍后加入 100 μL 1:200 稀释的人 Fc 封闭室温封闭 10 分钟。离心细胞后加入 1:200 稀释的流式抗体 (PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD19 (Biolegend, 302230), APC anti-human CD69 (Biolegend, 310910)), 4℃孵育 0.5 小时。离心去除上清，

细胞用 FACS 缓冲液洗涤两次后，用 200μL PBS 重悬细胞，流式细胞仪（BD FACS Celesta）检测细胞表面的荧光强度。

结果如图 4 所示，CD40 激动性抗体 9E5-SELFNS（WO2020108611A1）剂量依赖地激活 B 细胞，而 9E6-L4H2 和 2F12-L4H2 在 2.5 nM 下仍然没有表现出明显的 B 细胞激动活性。

实施例 12. 小鼠 T 细胞依赖的体液免疫反应（TDAR）模型

雌性人 CD40 转基因小鼠，6-7 周龄，购自百奥赛图江苏基因生物技术有限公司。饲养环境：SPF；生产许可证：SCXK（苏）-2016-0004；人 CD40 转基因小鼠合格证编号：320726200100167773。动物到达后适应性饲养 7 天，随机分组。实验第 0 天，各组小鼠取 1 只采血，之后腹腔注射给药。第 1 天时小鼠腹腔注射 50 μg KLH（KLH：弗氏完全佐剂 CFA=1：1 乳化免疫复合物）/只免疫。实验第 15 天时，腹腔注射 50 μg KLH（KLH：弗氏不完全佐剂 IFA=1：1 乳化免疫复合物）/只进行二次免疫。各组药物每周腹腔注射 2 次，分别于第 7、14、21 和 28 天经眼眶静脉丛采血~150 μL。全血室温放置 1-4 小时，7000 rpm 速度 4℃离心 10 分钟分离血清-80℃保存备用。具体实验流程如图 5A 所示。

具体给药方案如表 15 所示，每周分离小鼠血清并用 ELISA 检测抗 KLH 的特异性 IgG 水平。

表 15.小鼠 TDAR 模型实验给药方案

	分组	给药	N	剂量	频率
hCD40转基因小鼠	1	IgG1	5	1 mg/kg	BIW
	2	CFZ533	5	1 mg/kg	BIW
	3	CFZ533	5	0.3 mg/kg	BIW
	4	9E6-L4H2	5	1 mg/kg	BIW
	5	9E6-L4H2	5	0.3 mg/kg	BIW
	6	2F12-L4H2	5	1 mg/kg	BIW
	7	2F12-L4H2	5	0.3 mg/kg	BIW

结果如图 5B 和表 16 所示，1 mg/kg CD40 拮抗型抗体显著抑制两次免疫后抗 KLH 特异 IgG 的产生。低剂量 0.3 mg/kg 9E6-L4H2 和 2F12-L4H2 相比同剂量 CFZ533 对两次免疫后抗 KLH 的 IgG 的产生有更优的抑制作用。

表 16. 抗 CD40 抗体对免疫后 IgG 产生的抑制作用（0.3 mpk）

	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
给药前	0	0	0	0
IgG1	1.5±0.4	247.4±33.1	2187±1248	4773±2280
CFZ533 (0.3 mpk)	0.04±0.01	30.9±10.8	845±423	3043±1600
9E6-L4H2 (0.3 mpk)	0.002±0.001	0.02±0.01	0	18.25±8.9
2F12-L4H2 (0.3 mpk)	0.22±0.14	33.4±25.8	175.5±103	805.7±415.6

实施例 13. 小鼠皮肤移植排异模型

雄性 Balb/c 小鼠，6 周龄，购自上海市计划生育科学研究所实验动物经营部。
饲养环境：SPF；合格证编号：20180006023393。

雌性人 CD40 转基因小鼠，6-7 周龄，购自百奥赛图江苏基因生物技术有限公司。饲养环境：SPF；合格证编号：320726200100179778。

5 动物到达后适应性饲养 7 天，随机分组。实验第-2 天，小鼠腹腔注射他克莫司 FK506 或 CD40 拮抗型抗体。实验第 0 天，4%水合氯醛麻醉供体 Balb/c 小鼠和 C57BL/6J 小鼠，取下供体小鼠尾巴，分离整圈长度 1cm 尾部皮肤。受体小鼠背部去毛，沿皮肤层切口，在保留背部脂肪和结缔组织的情况下去掉等面积的皮肤，将供体皮肤放置于受体小鼠切口处，使用胶水缝合边缘皮肤，放入笼中恢复。具
10 体实验流程如图 6A 所示。

通过表 17 的给药方案给药小鼠，小鼠恢复 7 天后，每天观察小鼠皮肤生存情况，根据排异评分记录排异分数。评分体系如下，3：皮肤没有出现红色，光滑；2：部分皮肤发红，失去光泽，干燥；1：皮肤大部分变红，没有条纹，缩水；0：移植排异导致 80% 的皮肤坏死。

15 表 17.小鼠皮肤移植排异模型给药方案

	分组	给药	N	剂量	给药途径
供体: Balb/c 受体: hCD40转基因小鼠 C57BL6/J	1	对照组 (同种移植)	2	IgG1 10 mg/kg	ip
	2	模型组 (异种移植)	7	IgG1 10 mg/kg	ip
	3	CFZ533	7	3 mg/kg	ip
	4	CFZ533	7	10 mg/kg	ip
	5	9E6-L4H2	7	3 mg/kg	ip
	6	9E6-L4H2	7	10 mg/kg	ip
	7	2F12-L4H2	7	3 mg/kg	ip
	8	2F12-L4H2	7	10 mg/kg	ip
	9	他克莫司	6	3 mg/kg	ip
	10	9E6-L4H2 + 他克莫司	6	10 mg/kg + 3 mg/kg	ip
	11	2F12-L4H2 + 他克莫司	6	10 mg/kg + 3 mg/kg	ip

结果如图 6B 和表 18-表 20 所示，CD40 拮抗型抗体相比模型组均能显著改善小鼠皮肤移植评分，并延长皮肤移植物的存活时间。在对皮肤移植评分的过程中，由于之前看不出来是否有排异，是从第 8 天开始进行评分。9E6-L4H2 和 2F12-L4H2 相比对照抗体 CFZ533 表现出更优的抗移植排异活性。

表 18. 抗 CD40 抗体的第 15 天皮肤移植物生存率 (%)

	皮肤移植物生存率 (%)		皮肤移植物生存率 (%)
对照(control)	100%	对照(control)	100%
模型(model)	0%	模型(model)	0%
CFZ533(3mpk)	0%	CFZ533(10mpk)	0%
9E6-L4H2(3mpk)	28.5%	9E6-L4H2(10mpk)	14.3%
2F12-L4H2(3mpk)	28.5%	2F12-L4H2(10mpk)	42.9%

表 19. 抗 CD40 抗体的皮肤移植物评分 (3mpk)

	8 天	10 天	15 天	20 天
对照(control)	3	3	3	3
模型(model)	0.7	0	0	0
CFZ533(3mpk)	2.7	2.1	0	0
9E6-L4H2(3mpk)	3	2.7	0.6	0
2F12-L4H2(3mpk)	2.9	2.4	0.6	0.1

表 20. 抗 CD40 抗体的皮肤移植物评分（10mpk）

	8 天	10 天	15 天	20 天
对照(control)	3	3	3	3
模型(model)	0.7	0	0	0
CFZ533(10mpk)	2.9	2.1	0	0
9E6-L4H2(10mpk)	3	2.7	0.3	0
2F12-L4H2(10mpk)	2.7	2.4	0.9	0.4

此外，如图 7 和表 21-表 23 所示，9E6-L4H2 和 2F12-L4H2 联用他克莫司后对
5 抗小鼠皮肤移植排异有进一步的增效。

表 21. 抗 CD40 抗体和他莫克司联用的第 15 天皮肤移植物生存率

	皮肤移植物生存率 (%)		皮肤移植物生存率 (%)
对照(control)	100%	对照(control)	100%
模型(model)	0%	模型(model)	0%
FK506(3mpk)	16.7%	FK506(3mpk)	16.7%
9E6-L4H2(10mpk)	14.3%	2F12-L4H2(10mpk)	42.9%
9E6-L4H2(10mpk) +FK506	33.3%	2F12-L4H2(10mpk) +FK506	83.3%

表 22. 抗 CD40 抗体和他莫克司联用的皮肤移植物评分

	8 天	10 天	15 天	20 天
对照(control)	3	3	3	3
模型(model)	0.7	0	0	0
FK506(3mpk)	2.5	1.5	0.5	0
9E6-L4H2(10mpk)	3	2.7	0.3	0
9E6-L4H2(10mpk)+FK506(3mpk)	2.3	1.5	0.7	0.7

10

表 23. 抗 CD40 抗体和他莫克司联用的皮肤移植物评分

	8 天	10 天	15 天	20 天
对照(control)	3	3	3	3
模型(model)	0.7	0	0	0
FK506(3mpk)	2.5	1.5	0.5	0
2F12-L4H2(10mpk)	2.7	2.4	0.9	0.4
2f12-L4H2(10mpk)+FK506(3mpk)	2.7	2.3	1.5	0.8

实施例 14. 人源化抗 CD40 抗体在人 CD40 转基因小鼠中的 PK 检测

雌性人 CD40 转基因小鼠，6-7 周龄，购自百奥赛图江苏基因生物技术有限公司。饲养环境：SPF；生产许可证：SCXK（苏）-2016-0004；人 CD40 转基因小鼠合格证编号：320726200100154632。动物到达后适应性饲养 7 天，随机分组。实验第 0 天，各组小鼠 10 mg/kg 腹腔注射抗 CD40 抗体，于给药后 15 分钟，4 小时，8 小时，第 1，2，4，7，10 和 14 天，分别采血 100-150 μ L，使用 10 μ L EDTA-K2（0.1M）抗凝，冰上保存。用 ELISA 检测不同时间点小鼠血浆中的抗体浓度。具体检测方法如下：将山羊抗人 IgG Fc 抗体（Rockland, Cat#609-101-017）用 PBS 稀释至 2.5 μ g/ml，50 μ L/每孔加入 96 孔板中，4 度孵育过夜。洗液洗三遍后，每孔加入 50 μ L 封闭液，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。加入小鼠血浆和待检测抗体的标准曲线，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。洗液洗三遍，按 50 μ L/每孔加入抗 hlgG Fab-HRP（Sigma, Cat#A0293，1：10000），室温孵育 1 小时。洗液洗三遍。每孔加入 100 μ L TMB，避光反应 5 分钟。每孔加入 100 μ L 的 0.16 M 硫酸。Envision 酶标仪读取 450 nm OD 值，计算 CD40 拮抗型抗体的浓度。

结果如表 24 和图 8 所示，9E6-L4H2，2F12-L4H2 和对照分子 CFZ533 在人 CD40 转基因小鼠中有相似的 PK 特征。

表 24. CD40 拮抗型抗体在 hCD40 转基因小鼠中的 PK 数据

	CFZ533	9E6-L4H2	2F12-L4H2
T1/2 (h)	214.8	226.8	257.1
Cmax (mg/L)	75.95	85.8	88.78
AUC _(0-d14) ((h)*(mg/L))	12655	13439	12014

实施例 15. 人源化抗 CD40 抗体与人 FcRn 的亲合力测定

将待测抗体亲和捕获在抗人 Fab 的芯片上，然后于芯片表面流经一系列浓度梯度下的人 FcRn 抗原（购自 AcroBiosystem），利用 Biacore 仪器实时检测反应达到稳态时的信号。实验中用到的缓冲液为 HBS-EP+ 10 $\times$ 缓冲溶液 (Cat. # BR-1006-69, GE)，用 D. I. Water 稀释至 1 $\times$ （pH 7.4）。实验得到的数据以稳态结合（Steady State Binding）模型进行拟合，得出亲和力数值，见表 25。相比母本抗体，携带 AAYTE 突变的抗 CD40 抗体与人 FcRn 有更高的结合亲和力。

表 25. 人源化抗 CD40 抗体与人 FcRn 的亲合力测定

流动相	固定相	KD (M)
人 FcRn	2F12-L4H2	2.79E-07
	2F12-L4H2-AAYTE	4.42E-08
	9E6-L4H2	2.93E-07
	9E6-L4H2-AAYTE	3.98E-08

实施例 16. Fc 携带 AAYTE 突变的抗 CD40 抗体在 B 细胞激活实验体系中的

抑制活性

参照实施例 10 中的方法，检测 Fc 上携带 AAYTE 突变的抗 CD40 抗体 2F12-L4H2-AAYTE、9E6-L4H2-AAYTE 在 B 细胞激活实验体系中的抑制活性。结果如图 9A 至图 9B 所示，Fc 突变的抗 CD40 抗体与母本抗 CD40 抗体具有相似的 B 细胞抑制活性。

实施例 17. Fc 携带 AAYTE 突变的抗 CD40 抗体在 DC 细胞激活实验体系中的抑制活性

参照实施例 11 中的方法，检测 Fc 上携带 AAYTE 突变的抗 CD40 抗体 2F12-L4H2-AAYTE、9E6-L4H2-AAYTE 在 DC 细胞激活实验体系中的抑制活性。结果如图 10A 至图 10D 所示，Fc 突变抗 CD40 抗体与母本抗 CD40 抗体具有相似的 DC 细胞抑制活性。

权利要求书:

1. 抗 CD40 抗体或其抗原结合片段, 包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 其中:
 - a-1) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 67 或 68 任一所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 63-66 任一所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;
 - a-2) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 1 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 2 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;
 - a-3) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 3 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 4 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;
 - a-4) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 5 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 6 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;
 - b-1) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 81 或 82 任一所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 77-80 任一所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;
 - b-2) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 7 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 8 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;
 - b-3) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 9 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 10 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;
 - b-4) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 11 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 12 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;
 - b-5) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 13 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 14 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;
 - b-6) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 15 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 16 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;
 - b-7) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 17 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 18 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;
 - c) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 19 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 20 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3; 或
 - d) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 21 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 22 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;其中, 所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的, 优选为 Kabat 编号系统定义的。
2. 如权利要求 1 所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段, 其包含:
 - 1) 重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 分别包含如 SEQ ID NO: 23、24、25 所示的序列, 和轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 分别包含如 SEQ ID NO: 74、75、76 所示的序列;
 - 2) 重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 分别包含如 SEQ ID NO: 88、89、90 所

示的序列，和轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:91、37、92 所示的序列；

3) 重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:51、52、53 所示的序列，和轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:54、55、56 所示的序列；或

4) 重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:57、58、59 所示的序列，和轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:60、61、62 所示的序列；

优选地，1) 中的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含：

10 1-1) 重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；和轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:29、30、73 所示的序列；

1-2) 重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；和轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:26、27、15 28 所示的序列；

1-3) 重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；和轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:29、27、32 所示的序列；

优选地，2) 中的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含：

20 2-1) 重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:39、47、49 所示的序列；轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:87、50、48 所示的序列；

2-2) 重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:33、34、35 所示的序列；和轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:36、37、25 38 所示的序列；

2-3) 重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:39、40、41 所示的序列；和轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:42、37、43 所示的序列；

2-4) 重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:39、44、35 所示的序列；和轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:45、37、46 所示的序列；

2-5) 重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:39、47、41 所示的序列；和轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:36、37、48 所示的序列；

35 更优选地，1-1) 中的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含：

重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；轻链 LCDR1，包含如 SEQ ID NO:29 所示的序列；轻链 LCDR2，包含如 SEQ ID NO: 30 所示的序列；轻链 LCDR3，包含如 SEQ ID NO:69-72 任一所示的序列；

更优选地，2-1) 中的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，包含：

重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别包含如 SEQ ID NO:39、47、49 所示的序列；轻链 LCDR1，包含如 SEQ ID NO:83-86 任一所示的序列；轻链 LCDR2，包含如 SEQ ID NO:50 所示的序列；和轻链 LCDR3，包含如 SEQ ID NO: 48 所示的序列。

5

3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，其为重组抗体、兔源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或其抗原结合片段。

4. 根据权利要求 3 所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，其中：

10 所述人源化抗体或其抗原结合片段的重链框架区源自 IGHV2-26*01、IGHV4-30-4*02、IGHV4-4*08、IGHJ1*01；和/或，轻链框架区源自 IGkV1-13*02、IGkV1-9*01、IGkV1-6*01、IGKJ4*01；

优选地，重链框架区的 FR1-FR3 源自 IGHV2-26*01、IGHV4-30-4*02、IGHV4-4*08，重链框架区的 FR4 源自 IGHJ1*01；轻链框架区的 FR1-FR3 源自
15 IGkV1-13*02、IGkV1-9*01、IGkV1-6*01，轻链框架区的 FR4 源自 IGKJ4*01。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，其中：

A-1)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 67 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 63-66 任一所示或与之具有至少 90%同一性；

20 A-2)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 68 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 63-66 任一所示或与之具有至少 90%同一性；

A-3)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示或与之具有至少 90%同一性；

A-4)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示或与之具有至少 90%同一性；
25

A-5)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示或与之具有至少 90%同一性；

B-1)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 81 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 77-80 任一所示或与之具有至少 90%同一性；

30 B-2)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 82 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 77-80 任一所示或与之具有至少 90%同一性；

B-3)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示或与之具有至少 90%同一性；

B-4)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示或与之具有至少 90%同一性；
35

B-5)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示或与之具有至少 90%同一性；

B-6)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示或与之具有至少 90%同一性，VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示或与之具有至少 90%同一性；

40 B-7)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示或与之具有至少 90%同一性，

VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示或与之具有至少 90% 同一性;

B-8)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示或与之具有至少 90% 同一性,

VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示或与之具有至少 90% 同一性;

5 C)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示或与之具有至少 90% 同一性, VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示或与之具有至少 90% 同一性; 或

D)VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示或与之具有至少 90% 同一性, VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示或与之具有至少 90% 同一性。

6. 根据前述权利要求任一项所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段, 其还含有 IgG 抗体的 Fc 区; 优选地, 所述 IgG 抗体为 IgG1、IgG2 或 IgG4 抗体; 更优选地, 所述 Fc 区为含有 N297A 突变的 IgG1 的 Fc 区, 或为具有 L234A、L235A、M252Y、S254T、T256E 中任一个或多个突变的 IgG1 的 Fc 区。

7. 根据前述权利要求任一项所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段, 所述抗原结合片段为 scFv、Fv、Fab 或 Fab' 片段。

8. 根据前述权利要求任一项所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段, 其中: 重链全长的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 93 或 97 所示或与之具有至少 90% 同一性; 轻链全长的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 94 所示或与之具有至少 90% 同一性; 或

20 重链全长的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 95 或 98 所示或与之具有至少 90% 同一性; 轻链全长的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 96 所示或与之具有至少 90% 同一性。

9. 根据权利要求 1-8 任一项所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段, 其具有以下至少一项:

- i) 以 10nM 或更低的 K_D 结合人 CD40;
- ii) 无明显的激动活性。

10. 经分离的多核苷酸, 其编码权利要求 1-9 任一项所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。

11. 载体, 其含有权利要求 10 所述的多核苷酸。

12. 宿主细胞, 其含有权利要求 10 所述的多核苷酸或权利要求 11 所述的载体。

13. CD40 结合分子, 其含有权利要求 1-9 任一项所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。

40 14. 药物组合物, 其含有权利要求 1-9 任一项所述的抗 CD40 抗体或其抗原结

合片段，以及至少一种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

15. 如权利要求 14 所述的药物组合物，其还含有他克莫司。

5 16. 治疗自身免疫疾病的方法，包括：

向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求 1-9 任一项所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，或权利要求 14 所述的药物组合物；

所述自身免疫疾病优选为干燥综合征、多发性硬化或红斑狼疮，更优选为系统性红斑狼疮。

10

17. 权利要求 1-9 任一项所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段用于制备治疗自身免疫疾病的药物的用途；

所述自身免疫疾病优选为干燥综合征、多发性硬化或红斑狼疮，更优选为系统性红斑狼疮。

15

18. 治疗移植抗宿主病或缓解移植排异反应的方法，包括：

向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求 1-9 任一项所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，或权利要求 14-15 中任一项所述的药物组合物；

所述移植优选为实体器官移植，更优选为肝、肾、心脏、肺移植。

20

19. 权利要求 1-9 任一项的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段和他克莫司联合用于制备治疗移植抗宿主病或缓解移植排异反应的药物的用途；

所述移植优选为实体器官移植，更优选为肝、肾、心脏、肺移植。